



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular

**Estudio de la función de Gα_{i2} sobre la polaridad celular y
dinámica de los microtúbulos durante la migración colectiva en
células de la Cresta Neural Craneal de *Xenopus***

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas área Biología Celular y
Molecular
SORAYA CONSTANZA VILLASECA HERRERA
CONCEPCIÓN-CHILE
2023

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

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Señalización y Desarrollo del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

Dra. Marcela Torrejón
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora

Dr. Juan Pablo Henríquez
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Patricio Castro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Álvaro Glavic
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Director de Programa

Dr. Ariel Castro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Marcela Torrejón por su guía y supervisión, por darme la libertad de ser autónoma en mi investigación, por confiar 100% en mi trabajo y por su tremenda calidad como persona, como docente, investigadora y como compañera de baile.

A FONDECYT y ANID por otorgarme los medios económicos y las becas necesarias para llevar a cabo esta tesis doctoral. También al programa de Doctorado en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular, y en especial a su director de programa Dr. Ariel Castro, por su gran apoyo durante todo mi período de estudio. Por la tremenda ayuda económica que me brindaron durante congresos científicos nacionales e internacionales, y por las becas que me otorgaron para culminar mi doctorado satisfactoriamente.

A mis padres por permitirme escoger libremente mi carrera y mi futuro, por su apoyo incondicional y por su confianza en mí. Los amo. Terminé de construir mi polea, ahora la empiezo a embellecer.

A Cecilia por ser mi mejor amiga, mi confidente, por reemplazarme en las clases de flamenco cada vez que tenía un congreso o alguna cosa científica. Te amo hermanita. Ahora sigues tú.

A mi lela Sonia, que extraño todos los días, pero que sé estuvo moviendo todas las fichas desde el cielo para que yo tuviera éxito en este doctorado. Te amo por siempre.

A mi tata Rafael, por su cariño inmenso y por emocionarse siempre por mis logros. Te amo tatita.

Y finalmente, pero no menos importante, a mi Gustavo por su apoyo inmenso, por sus maravillosas ilustraciones científicas, por ser mi fan número uno, por acompañarme en este camino y seguirme a Cambridge, o al fin del mundo si es necesario con tal de conseguir mis sueños. Te amo.

Tabla de Contenidos

Resumen	9
Summary	11
Introducción	13
1. Cresta Neural	13
1.1 Inducción y mantenimiento de la Cresta Neural.....	15
1.2 Migración de la Cresta Neural Craneal	18
1.2.1 Quimio-atracción durante la migración de la cresta neural craneal ...	19
1.2.2 Proteínas de la familia Rho GTPasas	20
1.2.3 Microfilamentos de Actina.....	23
1.2.4 Interacción célula-matriz durante la migración celular	25
1.2.5 Adhesiones focales durante la migración celular	27
2. Estructura y función de los Microtúbulos durante la migración celular	33
2.1 Estructura de los microtúbulos.....	34
2.2 Inestabilidad dinámica de los microtúbulos.....	35
2.3 Dinámica de los microtúbulos	36
2.4 Proteínas asociadas a microtúbulos	39
2.4.1 Proteínas de seguimiento del extremo más (+TIPs)	39
2.4.2 Proteínas EB, “end binding protein”	41
2.4.3 +TIPs y la dinámica de los microtúbulos dentro de la célula	43
2.5 Microtúbulos y su relación con las adhesiones focales.....	44
2.6 Microtúbulos y su relación con las GTPasas de la familia Rho	45
3. Función de la Subunidad Gai2 en disitintos contextos celulares.....	48
3.1 Proteína G heterotrimérica.....	48
3.2 Subunidad Gai	49
3.3 Gai2 y migración celular en el sistema inmune.....	50
3.4 Gai y microtúbulos	51
3.5 Microtúbulos y proteína G heterotrimérica	53
Planteamiento del problema y contexto del trabajo de tesis:	56

Hipótesis.....	57
Materiales y Métodos	59
Materiales	59
Métodos	61
1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas	61
1.1 Obtención de ovocitos de <i>Xenopus tropicalis</i> y fertilización <i>in vitro</i>	61
1.2 Obtención de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> y fertilización <i>in vitro</i>	62
1.3 Microinyección de embriones.....	63
1.4 Fijación de embriones.....	64
1.5 Hibridación <i>in situ</i> en embrión completo	65
1.6 Explantes de Crestas Neurales Craneales	66
1.7 Ensayos de inmunodetección por microscopía de fluorescencia.....	67
1.8 Ensayos de “time-lapse”	68
1.9 Estudio de la polaridad celular	69
1.10 Estudio de la dinámica de los MTs (Ensayo de cometas).....	71
2. Técnicas de Biología Molecular	72
2.1 Síntesis de sonda y ARN mensajero <i>in vitro</i>	72
2.2 Lisis de embriones	73
2.3 Detección de proteínas mediante Western Blot	73
2.4 Co-inmunoprecipitación	74
Resultados	76
I. Gai2 es requerida para la migración de las células de la cresta neural craneal (CNC) en <i>Xenopus</i>	76
II. Gai2 es requerida para mantener la dinámica de actina, la distribución de tubulina y la morfología de las células de la cresta neural craneal en <i>Xenopus</i>	80
III. Gai2 es requerida para mantener la dinámica de los microtúbulos durante la migración de la CNC en <i>Xenopus</i>	87
IV. Nocodazol rescata la migración en células morfantes para Gai2 a través de la despolimerización de los microtúbulos	93
V. Gai2 es requerida para mantener la dinámica de las adhesiones focales durante la migración de la CNC en <i>Xenopus</i>	96

VI. Gai2 es requerida para mantener la polaridad celular durante la migración de la CNC en <i>Xenopus</i>.....	101
VII. El inhibidor de Rac1, NSC23766, rescata la dinámica de los microtúbulos en células morfantes para Gai2 y la isoforma constitutivamente activa de Rac1, RacV12, imita el fenotipo morfante de Gai2	107
VIII. El inhibidor de Rac1 NSC23766 rescata parcialmente la migración radial de las células de CNC	111
Discusión.....	115
I. Gai2 regula positivamente la dinámica de los microtúbulos para una correcta migración de las CNC	117
II. Gai2 controla la dinámica de las adhesiones focales a través de la regulación de la dinámica de los MTs.....	123
III. Gai2 controla la dinámica de actina a través de la regulación de la dinámica de los MTs.....	126
IV. Gai2 regula la polaridad celular durante la migración a través del control de la dinámica de los MTs.....	128
Conclusiones.....	132
Referencias	136

Tabla de Figuras

Figura 1: Migración de la CN y su contribución a la formación de una gran variedad de tejidos órganos.....	14
Figura 2: Modelo de especificación de la Cresta Neural.....	17
Figura 3: GTPasas de la familia Rho en la migración celular.....	22
Figura 4: Formación y maduración de la adhesión focal.....	33
Figura 5: Dinámica de los MTs.....	36
Figura 6: MTs durante la migración colectiva.....	47
Figura 7: Vía de señalización no canónica de Gai regula la división asimétrica.....	53
Figura 8: Modulación del ensamblaje de los MTs por la proteína G heterotrimérica.....	55
Figura 9: La pérdida de función de Gai2 inhibe la migración de las células de CNC <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	78
Figura 10: La pérdida de función de Gai2 altera la dinámica del citoesqueleto de actina de las células de CNC.....	82
Figura 11: La pérdida de función de Gai2 altera la distribución del citoesqueleto de actina y tubulina en células de CNC, distribución que se restaura parcialmente con Nocodazol.....	85
Figura 12: Nocodazol restaura parcialmente la morfología de células morfantes para Gai2 durante la migración de la CNC.....	86
Figura 13: Las células morfantes para Gai2 muestran un aumento en la tubulina estable y Gai2 interacciona con diferentes componentes de la dinámica de los microtúbulos.....	90
Figura 14: Las células morfantes para Gai2 tienen microtúbulos menos dinámicos en comparación a las células control.....	91
Figura 15: El tratamiento con Nocodazol de células morfantes para Gai2 restaura la migración radial de las células de CNC.....	95
Figura 16: Las células morfantes para Gai2 poseen adhesiones focales más grandes y más estables en el tiempo que las células controles.....	99
Figura 17: Las células morfantes para Gai2 poseen una dinámica de desensamblaje de AF más lenta que las células controles.....	100

Figura 18: Las células morfantes para Gai2 pierden la localización de proteínas de polaridad celular como ζ PKC y Par3.....	104
Figura 19: Las proteínas Rac1 y RhoA activas cambian su localización bajo condiciones de disminución de la expresión de Gai2 y Nocodazol rescata el fenotipo morfante para Gai2.....	105
Figura 20: NSC23766 rescata la dinámica de los microtúbulos en explantes tratados con morfolino de Gai2 y RacV12 imita el fenotipo morfante de Gai2.....	109
Figura 21: El inhibidor NSC23766 rescata parcialmente el fenotipo morfante de Gai2.....	113
Figura 22: Modelo Molecular.....	134
Figura 23: Modelo Celular.....	135

Resumen

La dinámica de los microtúbulos es esencial para la mantención de la polaridad celular durante la migración, ya que intervienen en el tráfico y destino de las proteínas requeridas para establecer una correcta polaridad antero-posterior. Sin embargo, cambios en la estabilidad de los microtúbulos podrían contribuir a la pérdida de esta polaridad, a la disrupción del desensamblaje de las adhesiones focales, a un cambio severo en el nivel de polimerización del citoesqueleto de actina, en resumen, afectar la migración celular colectiva. Análisis previos en nuestro laboratorio muestran que la proteína G heterotrimérica, específicamente Gai2, regula la migración de las células de la Cresta Neural Craneal (CNC), ya que la pérdida de función de Gai2 se traduce en la inhibición de la migración de estas células y deslocalización de proteínas de polaridad celular como Par3 y ζ PKC, resultados que se apoyan con estudios de otros investigadores en células del sistema inmune, donde también la ausencia de Gai2 inhibe la migración de los linfocitos T y macrófagos hacia los sitios de inflamación. Adicionalmente, también se ha reportado en *C. elegans* que Gai controla la polaridad celular durante la división asimétrica, a través de la regulación de las fuerzas de los microtúbulos para orientar correctamente el huso mitótico. Por lo tanto, con el fin de indagar en el mecanismo funcional de la subunidad Gai2 durante la migración celular, y con ello su posible contribución a regular los microtúbulos y la polaridad celular, en esta tesis se investigó el papel de la subunidad Gai2 de la proteína G heterotrimérica en la CNC, una población embrionaria que migra extensivamente y colectivamente a lo largo del embrión con el fin de formar otros tejidos. Nuestros resultados muestran que Gai2 se localiza en toda la célula, pero en la corteza celular se localiza cercana a la red de microtúbulos, posiblemente controlando la dinámica de éstos. La disminución de la expresión de Gai2 a través de un morfolino específico, redujo fuertemente la despolimerización de los microtúbulos aumentando su estabilidad, afectando la polimerización del citoesqueleto de actina a través del aumento del tamaño de las protrusiones y el área de las adhesiones focales en el tiempo.

También observamos un aumento en la actividad de Rac1 en el borde libre y en el contacto célula-célula, cambiando la localización de RhoA hacia el borde director, lo que en conclusión afecta la migración de la CNC. Este efecto pudo ser rescatado con bajas concentraciones de nocodazol como droga despolimerizante de los microtúbulos, y sólo parcialmente por inhibición de Rac1. Además, encontramos que Gai2 interacciona con EB1, EB3, tubulina, α 5-integrina y ζ PKC, como se muestra por co-immunoprecipitación, lo que apoya el papel crítico de Gai2 en la dinámica de los microtúbulos, el desensamblaje de las adhesiones focales y la polaridad celular. Por lo tanto, nuestros resultados nos permiten proponer a Gai2 como un regulador maestro de la polaridad, morfología y dinámica de la adhesión célula-matriz, a través del control de la dinámica de los microtúbulos, y con ello, de la conversación cruzada entre los citoesqueletos de actina y tubulina, permitiendo de esta forma la correcta migración colectiva de las células de la CNC.

Summary

The microtubule dynamics is essential for the maintenance of cell polarity during migration. They are involved in the trafficking and destination of the required proteins to establish a correct antero-posterior polarity. Nevertheless, changes in the stability of microtubules could contribute to the loss of this polarity, the disruption of the focal adhesion disassembly, severe changes in actin polymerization level, in summary to affect collective cell migration. Previous analyzes in our laboratory have shown that the heterotrimeric G protein, specifically Gai2, regulates the Cranial Neural Crest (CNC) cells migration. The loss of function of Gai2 inhibits the migration of these cells and promote the misslocalization of polarity proteins such as Par3 and ζ PKC, results supported by other studies in immune system where the loss of function of Gai2 also inhibits the migration of macrophages and T lymphocytes towards the inflammation sites. Additionally, studies in *C. elegans* have described that Gai2 control de microtubules pulling forces to orientate the spindle correctly during asymmetric cell division.

Therefore, in order to investigate the functional mechanism of the Gai2 subunit during cell migration, and its possible contribution to regulating microtubules dynamics and cell polarity, in this thesis we investigated the role of the Gai2 subunit of the heterotrimeric G protein in the CNC cells, an embryonic population that extensively and collectively migrates throughout the embryo, in order to generate other tissues. Our results have shown that Gai2 is localized throughout the cell, but in the cell cortex it is localized close to the microtubules network, possibly controlling microtubules dynamics. The Gai2 expression was reduced through a specific morpholino, that strongly reduced the depolymerization of the microtubules, increasing their stability, affecting the actin polymerization increasing the protrusions size and the focal adhesions area. Also, Gai2 loss of function resulted in an increase of the Rac1 activity in the free edge and in the cell-cell contact, a changing in the location of RhoA towards the leading edge, which in conclusion affect CNC migration. These effects were restored by low concentrations of nocodazole

treatment, as microtubule depolymerizing drug, but partially rescued by Rac1 inhibition. In addition, we found that Gai2 interacts with EB1, EB3, tubulin, α 5-integrin and ζ PKC, as shown by co-immunoprecipitation, supporting a critical role for Gai2 in microtubule dynamics, focal adhesions disassembly and cell polarity. Therefore, our results together, allow us to propose to Gai2 as a master regulator of, cell polarity, morphology and cell-matrix adhesion dynamics, through the control of microtubule dynamics, contributing to the crosstalk between both cytoskeletons (actin and tubulin), thus allowing the correct collective migration of CNC cells.

Introducción

1. Cresta Neural

La Cresta Neural (CN) es un tejido embrionario transitorio que se origina en el borde de la placa neural de organismos vertebrados, y es capaz de migrar extensamente a través del embrión una vez que es delaminada desde la zona dorsal del tubo neural, diferenciándose en una gran variedad de tejidos (Fig. 1). Debido a que contribuye a la diferenciación de varios tipos celulares, el desarrollo aberrante de este tejido puede conducir a muchas enfermedades congénitas diferentes llamadas “neurocristopatías”, las cuales son estudiadas ampliamente utilizando a la CN como modelo (Sato y col., 2019).

La CN como tejido embrionario fue descrito por primera vez en el año 1868 por el científico Wilhelm His y llamado Cresta Neural por Arthur Milnes Marshall en 1879, y desde ese día los embriólogos la han utilizado como modelo de estudio para comprender la inducción de un tejido, la determinación del destino celular y los procesos migratorios que contribuyen a la destinación y diferenciación de los tejidos adultos. Algunas de las investigaciones que se han llevado a cabo para el entendimiento del cáncer han sido realizadas también en la CN. Específicamente el estudio de la migración colectiva y la invasión de estas células en el embrión se ha utilizado ampliamente para comprender el fenómeno de la metástasis (Theveneau y Mayor, 2012). De este modo, el estudio de la migración de la CN proporciona una gran cantidad de conocimientos que se pueden aplicar en distintas disciplinas, y constituyen el foco de esta tesis.

La población de la CN se puede dividir, según la posición a lo largo del eje anteroposterior, en la Cresta Neural Craneal (verde), Cresta Neural Cardíaca (azul), Cresta Neural del Tronco (azul), Cresta Neural Vagal (café) y Cresta Neural Sacra (café) (Fig. 1A). Durante este trabajo de tesis, como modelo para estudiar el comportamiento migratorio celular nos enfocamos en el estudio de la Cresta Neural

Craneal de *Xenopus* (*X. laevis* y *X. tropicalis*), la cual se diferencia en estructuras craneofaciales que incluyen los nervios craneales y los ganglios, la musculatura lisa y el tejido conjuntivo, los huesos, cartílago y la dermis (Theveneau y Mayor, 2011; Szabó y Mayor, 2018; Fig. 1A-C células y estructuras en color verde).

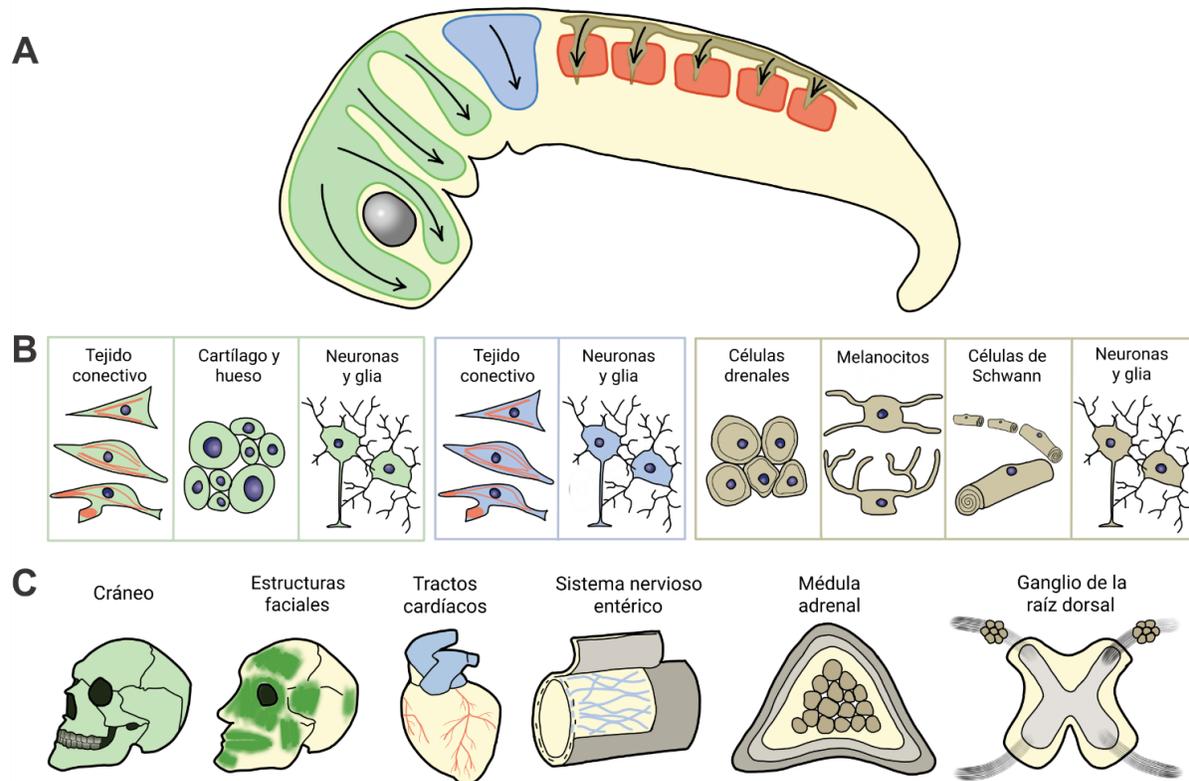


Figura 1. Migración de la CN y su contribución a la formación de una gran variedad de tejidos y órganos. (A) Las células de la CN migran desde la cara dorsal del tubo neural a disitintos lugares del embrión en desarrollo. **(B-C)** Una vez que han alcanzado sus sitios blancos, se diferencian y pueden formar tejido conectivo, cartílago y hueso, músculo liso, células pigmentarias y componentes del sistema nervioso (Adaptado de Szabó y Mayor, 2018).

1.1 Inducción y mantenimiento de la Cresta Neural

La CN se origina gracias a la diferenciación del ectodermo neural y no neural en el estadio de blástula tardía, a través de la formación del borde de la placa neural la cual se demarca en el límite entre ambos ectodermos. Específicamente durante el proceso de gastrulación, tanto los niveles de ácido retinoico (AR) como de factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) se encuentran altos, mientras que los niveles de Wnt se encuentran bajos (Moury y Jacobson, 1990; Selleck y Bronner-Fraser, 1995; Mancilla y Mayor, 1996). Para que la CN se induzca propiamente tal, se requiere un incremento en la actividad de Wnt y una inhibición de la señalización de la proteína morfogenética de hueso (BMP) (Fig 2), produciéndose un gradiente dorso-ventral de señalización BMP. Por lo tanto, es posible observar niveles altos de BMP en la epidermis, niveles intermedios en la CN prospectiva y niveles bajos en lo que será el neuroectodermo, gradiente necesario, pero no suficiente para inducir la formación de la CN (LaBonne y Bronner-Fraser, 1998; Marchant y col., 1998; Garcia-Castro y col., 2002; Linker y Stern, 2004; Delaune y col., 2005). La zona encargada de activar la señalización de Wnt e inhibir la señalización de BMP se conoce como zona marginal dorsolateral (DLMZ), la cual se encuentra junto a la CN prospectiva en la etapa de gástrula (Fig. 2B). Esta DLMZ expresa Wnt8 y chordin (un inhibidor de BMP), moléculas que son necesarias y suficientes para la inducción de la CN (Steventon y col., 2009).

Otra vía de señalización importante es Notch-Delta, la cual se sugiere controla la expresión de BMP en *D. rerio*, *G. gallus* y *X. laevis*, promoviendo el desarrollo de la CN al reprimir la neurogénesis (Cornell y Eisen, 2000; Endo y col., 2002; Glavic y col., 2004). Esta combinación de inductores de la CN (gradiente de BMP y la alta actividad de Wnt, FGF, AR y Notch) orquestan la expresión de diferentes factores de transcripción que controlan la especificación de las células de la CN.

El segundo paso para el desarrollo de la CN durante la neurulación es el mantenimiento. Durante este proceso se requiere de la actividad de Wnt (Carmona-Fontaine y col., 2007), y a diferencia de la inducción de la CN, la actividad de BMP

también es necesaria para el mantenimiento de la CN (Fig. 2B, néurula) (Steventon y col., 2009). Otras señales también aumentan durante este tiempo, como FGF y AR. Al mismo tiempo, se activa una red de genes necesarios para mantener los precursores de la CN. Específicamente en *Xenopus laevis*, el factor de transcripción *snail2* responde directamente a la señalización vía Wnt (Vallin y col., 2001). *Snail1* se expresa un poco antes que *snail2* y se encuentra río arriba de *snail2* (Aybar y col., 2003), sin embargo, algunos autores describen que ambos son necesarios y suficientes para el desarrollo de la CN (Labonne y Bronner-Fraser, 2000; Mayor y col., 2000; del Barrio y Nieto, 2002). *Snail2* promueve la expresión de otros genes de mantenimiento, los cuales incluyen *foxD3*, *sox9*, *sox10*, *id3* y *twist* (Labonne y Bronner-Fraser, 2000; Sasai y col., 2001; Aybar y col., 2003; Honore y col., 2003). Estos genes aseguran el mantenimiento de la población de células de la CN original al inhibir la muerte celular programada (apoptosis) y reduciendo la proliferación (Tribulo y col., 2004; Vega y col., 2004).

Posterior a la fase de mantenimiento, las células de la CN experimentan un proceso conocido como Transición Epitelio Mesenquimal (TEM) y las células de la CN se separan del neuroepitelio. Específicamente, TEM se refiere a la transición de un tejido epitelial completamente polarizado apico-basal, a un tejido mesenquimal gracias al cambio en la expresión de cadherinas (cambio de E-cadh a N-cadh), mientras que la delaminación describe el movimiento de las células de la CN lejos del neuroepitelio. Algunos genes de mantenimiento celular, como *sox10*, *sox9*, *snail2* y *foxD3* están involucrados en el proceso de delaminación (Cheung y col., 2005).

Es importante recalcar que si bien la especificación, la TEM y la delaminación se encuentran reguladas por los mismos genes de mantenimiento, son procesos completamente diferentes. Por ejemplo, la expresión ectópica de *sox9* específicamente puede inducir la CN pero no la TEM (Cheung y Briscoe, 2003). Al mismo tiempo, si no hay detención del ciclo celular entre G1 y S en la CN troncal no hay delaminación, pero la inducción de *snail2* no se ve afectada, por lo tanto la TEM puede ocurrir (Burstyn-Cohen y col., 2004), lo que indica que la TEM y la

delaminación son dos eventos separados. No obstante, en algunos casos los roles se superponen: Sox9 es importante en la especificación y supervivencia, pero también se coordina con Snail2 para desencadenar la TEM (Cheung y col., 2005). Para las etapas 19-20 en el embrión de *X. laevis*, la Cresta Neural Craneal (CNC) se ha restringido a una región específica, adyacente al tubo neural, convirtiéndose desde un tejido epitelial totalmente polarizado a células mesenquimáticas con alta capacidad migratoria (Theveneau y Mayor, 2012)

Finalmente, la migración de las células de la CNC comienza un poco antes del cierre del tubo neural, las cuales migran ventralmente por el lado de la futura cabeza del embrión y se dividen en tres corrientes: mandibular, hioidea y branquial, las cuales penetran en los arcos branquiales y migran extensa e invasivamente por la región anterior del embrión (Fig. 1A, corrientes de color verde).

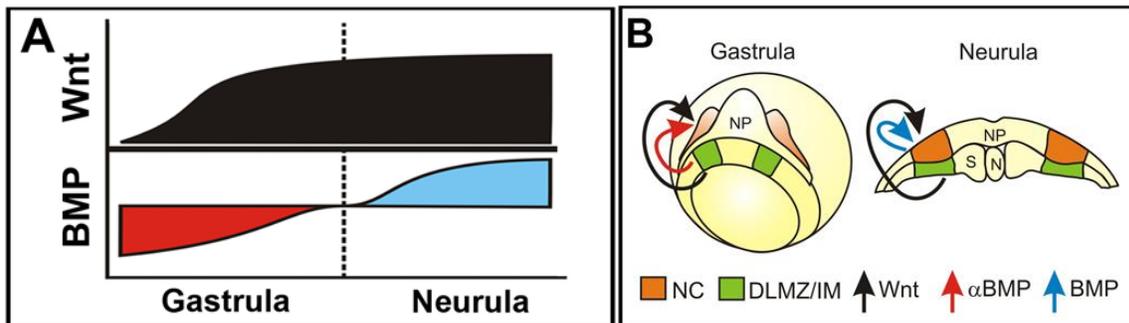


Figura 2. Modelo de especificación de la Cresta Neural. (A) Diagrama que resume los diferentes requerimientos temporales (Gástrula y Néurula) para las vías de Wnt y BMP durante el desarrollo de la CN. **(B)** Modelo de inducción de la CN durante la etapa de gástrula y mantenimiento de la CN en etapas de néurula (Adaptado de Steventon y col., 2009).

1.2 Migración de la Cresta Neural Craneal

La migración celular es esencial para muchos aspectos del desarrollo embrionario y mantenimiento de organismos pluricelulares. También juega un papel clave en otros procesos tanto fisiológicos como patológicos, como la cicatrización de heridas y reparación de tejidos, la correcta función del sistema inmune, el proceso de hematopoyesis, entre otros, los cuales requieren movimientos celulares sincronizados hacia lugares específicos (Mitchison y col., 1996). La migración colectiva tiene un papel clave durante la morfogénesis y la renovación de tejidos en el adulto, mientras que la migración aberrante puede conducir a diversas patologías como por ejemplo el cáncer (Weijer y col., 2009; Friedl y col., 2009). En consecuencia, ha sido intensamente estudiada.

La polaridad celular y la migración direccionada son conceptos que se encuentran muy relacionados entre sí, ya que la migración direccionada requiere del establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular. De hecho, el primer paso de la migración direccional es la polarización de la célula tanto a nivel morfológico como molecular, lo que lleva a la célula a tener dos extremos: un borde director y un borde posterior (Fig 3, borde celeste y borde amarillo). Este establecimiento de la polaridad celular puede ser en respuesta a una señal externa como por ejemplo los factores de crecimiento, ligandos o péptidos de matriz extracelular (ECM), pudiendo también ocurrir de manera espontánea (Sohrmann y Peter, 2003; véase también Altschuler y col., 2008). Algunas de las vías moleculares que controlan la polaridad celular durante la migración incluyen la localización de PI3K en la parte frontal y PTEN en la parte posterior (Kay y col., 2008), una distribución polarizada de los miembros de la vía de la polaridad celular planar (PCP) de Wnt (Carmona-Fontaine y col., 2008), GTPasas pequeñas como RhoA y Rac (Etienne-Manneville y Hall, 2002) y proteínas de partición defectuosa como Par3 y Par6 (Goldstein y Macara, 2007; Moore y col., 2013). Estas vías controlan las estructuras y procesos celulares, incluyendo el citoesqueleto de actina y tubulina, y serán discutidos con más detalle en esta introducción.

1.2.1 Quimio-atracción durante la migración de la cresta neural craneal

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). Para que las células de la CNC puedan desplazarse a través de las tres corrientes migratorias, éstas deben ser atraídas por moléculas especializadas llamada quimioquinas. Las células de la CNC responden a gradientes de una quimioquina llamada Factor derivado del estroma 1 (Sdf-1) ya que expresan el receptor acoplado a proteína G, receptor de quimioquinas 4, (CXCR4). Particularmente en *Xenopus* la señalización del par quimiotáctico Sdf-1/CXCR4 es esencial para la migración de la CNC, ya que fuentes locales de Sdf-1 son suficientes para atraer a las células de la CNC *in vivo* e *in vitro* (Theveneau y col., 2010), al igual que activa la señalización para el correcto posicionamiento de la raíz dorsal del ganglio, un derivado de CN, en *M. musculus* (Belmadani y col., 2005). Otros autores también plantean que en *D. rerio* el desarrollo craneofacial y los patrones melanóforos dependen de Sdf-1 (Svetic y col., 2007; Olesnicky Killian y col., 2009), de hecho los melanocitos de *D. rerio* son capaces de migrar hacia una fuente ectópica de Sdf-1 (Svetic y col., 2007).

Las células de la CN son capaces de interactuar entre ellas durante la migración direccionada a través del factor del complemento C3a, el cual es liberado por las mismas células las cuales también expresan el receptor C3aR (Carmona-Fontaine y col., 2011). Esto facilita el proceso de “co-atracción” entre las células de la CN que conduce a la activación de la proteína G pequeña Rac1, promoviendo la migración de las células como grupo hacia la fuente quimioatrayente C3a.

Tanto los receptores CXCR4 como C3aR corresponden a Receptores acoplados a Proteína G (GPCR), y ya se ha descrito al menos una subunidad de la proteína G heterotrimérica regulando la migración y la formación de adhesiones focales en la CNC de *Xenopus*, la subunidad G α 13 (Toro-Tapia y col., 2018). Sin embargo, en otras células migratorias como las células del sistema inmune, las cuales también expresan CXCR4, se ha visto a la subunidad G α i2 como la encargada de regular la migración de linfocitos T inducida por CXCL12 (también llamada Sdf1) (Hwang y col., 2007). Al respecto, en esta tesis estudiaremos la función de la subunidad G α i2 en la migración de la CNC en *Xenopus*.

1.2.2 Función de proteínas de la familia Rho GTPasas durante la migración celular

Durante la polarización de una célula migratoria deben ocurrir muchos cambios, entre los cuales destacan la generación de protrusiones en el borde director, se establecen interacciones entre la célula y el sustrato al cual se encuentra adherido y ocurre una remodelación coordinada del citoesqueleto de actina, cuya modulación está a cargo de proteínas G pequeñas de la familia Rho (Ridley y col., 2003). Específicamente RhoA, Rac1 y Cdc42, a través de sus ciclos de activación y desactivación (ciclos de unión a GTP y GDP, respectivamente), controlan la polaridad celular mediante la regulación de diferentes aspectos de la dinámica del citoesqueleto, por lo que juegan un papel crucial para la migración (Fig. 3). Durante la polarización de la célula, la parte frontal puede extender una protuberancia que podría ser un lamelipodio grande y plano, o bien una protuberancia delgada con forma de bastón el cual puede ser un filopodio (Fig. 3, borde amarillo). Rac1, en su estado activado unido a GTP (Rac1-GTP), promueve la formación de lamelipodios y “ruffles” de membrana regulando la polimerización de actina (Ridley y col., 1992), mientras que Cdc42-GTP controla la formación de filopodios (Kozma y col., 1995). RhoA-GTP generalmente se localiza en la parte posterior de la célula, particularmente porque Rac1 y RhoA se inhiben mutuamente (Rottner y col., 1999;

Fig. 3 borde celeste). Sin embargo, las tres GTPasas se pueden activar en el frente migratorio de las células, debido a que RhoA inicia la formación de una protuberancia, la cual es reforzada y estabilizada posteriormente por las GTPasas Rac1 y Cdc42 (Pertz y col., 2006; MacHacek y col., 2009).

Las GTPasas de la familia Rho son, por lo tanto, los principales reguladores de la polaridad y la migración celular. Se cree que el regulador maestro de la polaridad celular durante la migración es Cdc42, el cual recluta al complejo Par6/Par3/aPKC encargado de posicionar al centro organizador de microtúbulos (MTOC) y al Aparato de Golgi frente al núcleo en dirección hacia el frente migratorio (Etienne-Manneville y Hall, 2002; Ridley y col, 2003). De esta forma, Cdc42 promueve el crecimiento de los microtúbulos hacia la lamela, facilitando además la liberación de vesículas provenientes del Golgi hasta el borde director, trasladando proteínas requeridas en ese lugar para realizar una correcta migración celular (Etienne-Manneville y Hall 2002; Ridley y col, 2003). La proteína G pequeña Rac1 es capaz de activar diversas cascadas moleculares río abajo, ya que estimula proteínas tales como WAVE y Arp2/3 entre otras, lo que promueve la polimerización de actina en el borde director (Parri y Chiarugi, 2010). Por otro lado, RhoA activa principalmente a la proteína quinasa ROCK (“Rho-associated serine/threonine kinase”) la cual es la encargada de fosforilar la cadena liviana de la Miosina (dominio regulatorio específicamente, RLC: “Regulatory Light Chain”), que controla de forma directa a las fibras de estrés dependientes de actomiosina, modulando la contracción celular y las adhesiones focales (Parri y Chiarugi, 2010; Spiering and Hodgson, 2011).

Tal como se mencionó más arriba, Cdc42 está activa en la parte delantera de las células migratorias y se ha sugerido que es necesaria para la polaridad celular (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Sin embargo, en las células de la CNC, la interrupción de la polaridad celular al inhibir la PCP no tiene efecto sobre la actividad de Cdc42 (Matthews y col., 2008). Estos resultados, no pueden descartar una contribución de Cdc42 sobre la polaridad; no obstante, la actividad de Cdc42 parece no ser suficiente para regular la polarización y la formación de protrusiones en todos los tipos celulares.

Rac1, por otro lado, ha sido consistentemente implicada en la formación y extensión de las protrusiones, y por lo tanto, en la migración. Las células del borde del ovocito de *D. melanogaster* no pueden migrar cuando expresan una dominante negativa de Rac (Murphy y Montell, 1996), al igual que la inhibición de Rac1 en células germinales de *D. rerio* inhibe la formación de protrusiones y por lo tanto, la migración (Kardash y col., 2010). También se ha observado que la quimiotaxis está regulada por Rac1 en las células de la CN (Theveneau y col., 2010). Por lo tanto, Rac1 parece ser un importante controlador de la migración *in vivo*, incluso en la CN de distintas especies.

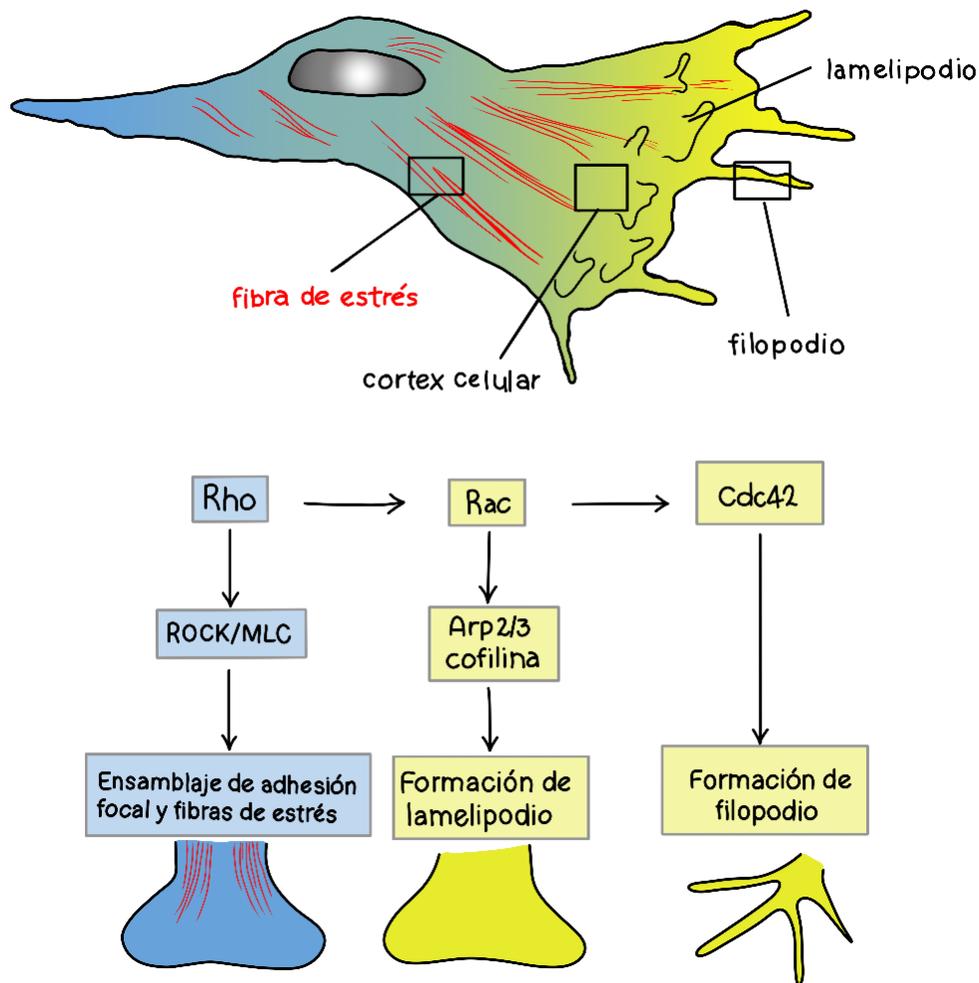


Figura 3. GTPasas de la familia Rho en la migración celular. La polaridad celular durante la migración direccional es influenciada por la actividad polarizada de GTPasas pequeñas de la familia Rho. Estas GTPasas controlan la dinámica de actina y la adhesión célula-

sustrato, así como también la dinámica de los microtúbulos. En el frente celular, Cdc42 promueve la formación de filopodios, mientras que la actividad de Rac1 promueve la formación de lamelipodios. RhoA en cambio promueve la retracción y contracción celular en el borde posterior de la célula y promueve el ensamblaje de las adhesiones focales y la formación de fibras de estrés. En color celeste se observa la localización polarizada de RhoA activa y en amarillo la localización polarizada de Rac1 y Cdc42 activas (Adaptado de Mayor y Carmona-Fontaine, 2010).

1.2.3 Microfilamentos de Actina durante la migración celular

La actina es una proteína globular que une ATP para formar polímeros llamados microfilamentos de actina, encargados de otorgarle la morfología y la motilidad a la célula. La actina se organiza diferente tanto en el borde anterior como en el borde posterior de una célula migratoria (Fig. 3). Por ejemplo, las fibras de estrés que conforman alrededor de 30 microfilamentos de actina asociados a la proteína Miosina II, se ubican generalmente en el borde posterior o cuerpo celular de una célula migratoria, lo que le confiere la capacidad contráctil necesaria para moverse hacia un sitio específico (Fig. 3, fibras en color rojo) (Murrell y col., 2015). Estas fibras de estrés se unen a las adhesiones focales (adhesiones entre la célula y la matriz extracelular), para permitir que la célula retraiga su borde posterior y de esta manera pueda avanzar (Pellegrin y Mellor, 2007).

También en el borde anterior de una célula migratoria podemos encontrar a la actina formando estructuras lineales y digitiformes llamadas filopodios, o bien estructuras con forma laminar llamadas lamelipodios (Fig. 3) (Machesky y col., 1999). En el caso de los lamelipodios, si bien los filamentos de actina polimerizan de forma lineal, se requiere de varias proteínas de unión a actina para estructurar la formación del lamelipodio, ya que requiere la ramificación de la actina para conformar una malla que le dé la morfología característica a los lamelipodios. En este caso el complejo Arp2/3, activado por las proteínas WASP/WAVE, permiten la adición de nuevos monómeros de actina en una dirección diferente al crecimiento lineal. Estas proteínas se conocen como proteínas “ramificadoras de la actina” ya que generan

un segundo extremo de crecimiento, lo que genera la bifurcación del microfilamento de actina (Machesky y col., 1999; Svitkina y Borisy, 1999).

Otra forma de estructuración de la actina, pero esta vez a la forma de haces paralelos, lo constituyen los filopodios cuya morfología es paralela, digitiforme y protruye desde el lamelipodio celular (Fig. 3). En el ensamblaje de los filopodios participan diversas proteínas como por ejemplo las forminas (mDia1-2) que aceleran la polimerización de actina, y que ayudan tanto a la formación de filopodios como lamelipodios y fibras de estrés, y evitan la unión de proteínas que favorezcan la despolimerización (Faix y col., 2009; Blanchoin y col., 2014; Rottner y Schaks, 2019). Otras proteínas como la fascina promueven la migración celular a través del entrecruzamiento y agrupación de los microfilamentos de actina, la cual renueva la F-actina de las adhesiones focales (Abercrombie y col., 1971; Mallavarapu y Mitchison, 1999).

Durante la migración celular, y en general durante todos los procesos celulares que involucren la polimerización y/o despolimerización de los microfilamentos de actina, ésta sufre un proceso conocido como “treadmilling” (Abercrombie y col., 1971). Cuando un microfilamento de actina se encuentra en crecimiento, se van adicionando monómeros de actina para la formación de un extremo “barbado”, el cual se posiciona en dirección hacia el frente migratorio. Asimismo, el desensamblaje de los microfilamentos de actina ocurre en el extremo posterior del lamelipodio, de manera de poder “reciclar” estos monómeros de actina. La actina globular (monomérica) que se une para polimerizar los microfilamentos de actina presenta un comportamiento cinético diferencial, dependiendo de si se encuentra unido a ATP o ADP. El ciclo se iniciará con la adición de los monómeros de actina unida a ATP a los extremos barbados, el cual será de polimerización rápida. Asimismo, en el borde posterior la actina hidrolizará ATP a ADP, de manera de que ahora la actina se encuentra unida a ADP, la cual se libera a la forma de monómeros desde el extremo menos dinámico (borde posterior del lamelipodio), para luego ser reutilizada en un nuevo ciclo de polimerización en el borde anterior (Rottner y Schaks, 2019; Watanabe y Mitchison, 2002)

Los microtúbulos participan en el tráfico polarizado de proteínas que regulan la polimerización de los microfilamentos de actina como EB1 y mDia1-2, las cuales participan en el ensamblaje de los microfilamentos de actina desde el extremo + de los microtúbulos (Wen y col., 2004). Además, las proteínas de unión a actina mDia1-2 y APC estabilizan a los microtúbulos (Mimori-Kiyosue y col., 2000; Wen y col., 2004), lo que demuestra que los microtúbulos y los microfilamentos de actina se encuentran estrechamente relacionadas entre sí.

1.2.4 Interacción célula-matriz durante la migración celular

Las protrusiones durante la migración son estabilizadas mediante las adhesiones célula-matriz denominadas complejos focales que, al menos *in vitro*, tienen una distribución puntiforme. Durante el proceso de ensamblaje del complejo focal la proteína G pequeña requerida es Rac1 (Rottner y col., 1999). La mayoría de estos complejos focales son desensamblados y ensamblados rápidamente a medida que la célula migra, mientras que algunos maduran y se transforman en adhesiones focales más grandes y estables gracias a la actividad de RhoA (Rottner y col., 1999).

Tanto los complejos focales como las adhesiones focales más estables se encuentran formados por integrinas y se ensamblan al citoesqueleto de actina a través de una serie de proteínas adaptadoras. Cuando los microfilamentos de actina se asocian a la proteína motora Miosina pueden formar fibras de estrés, las cuales son inducidas por RhoA y generan fuerzas de tracción y contracción ya que “tiran” a las adhesiones focales (Ridley y Hall, 1992), extendiendo la célula. RhoA actúa a través de la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK) para fosforilar a la Miosina e inhibir su fosfatasa, promoviendo la contractilidad de la actomiosina en la parte posterior de la célula donde se desensamblan las adhesiones focales (Fukata y col., 2003).

Tras la delaminación desde el tubo neural, las células de la CN comienzan a expresar las integrinas apropiadas para unirse a la matriz extracelular (MEC) y

migrar a lo largo del embrión. En *G. gallus* las proteínas de la MEC involucradas en la migración de las células de CN troncal son la fibronectina, el colágeno y la laminina (Bilozur y Hay, 1988), mientras que en *X. laevis* específicamente la fibronectina se localiza en las corrientes migratorias de la CNC, y actúa como un sustrato permisivo para la migración (Epperlein y col., 1988).

En la CNC migratoria de *X. laevis* se ha encontrado que la expresión de Integrina- $\alpha 5\beta 1$ se encuentra aumentada, posiblemente debido a la actividad de los especificadores de la CN: FoxD3 y Sox10 (Cheet y col., 2005), lo que les permite a las células migrar sobre fibronectina en lugar de vitronectina, laminina o colágeno (Alfandari y col., 2003). Es importante recalcar que las células de la CNC también pueden interactuar con la fibronectina a través de sindecano-4, la cual regula negativamente a Rac1 en las células de la CNC. sindecano-4 es necesario para la migración direccional (Matthews y col., 2008) y parece ser necesario para la formación de adhesiones focales (Woods y col., 2000). De hecho, se cree que podría estar involucrado en la reducción de la activación de Rac1 en los bordes laterales y en el borde posterior de las células, ya que la inhibición de sindecano-4 aumenta la activación de Rac1, formándose lamelipodios alrededor de toda la célula (Matthews y col., 2008). Sin embargo, el efecto de la interacción de sindecano-4 y fibronectina no puede ser explicado únicamente por la inactivación de Rac1, por lo que sindecano también podría estar involucrado en la vía PCP (Matthews y col., 2008).

Las células de la CNC no solo se adhieren a la MEC para facilitar su migración, sino que también deben degradarla para formar un camino a lo largo del cual migrar. La degradación de la MEC es lograda gracias a la expresión de una serie de metaloproteinasas de matriz (MMP) y metaloproteinasas relacionadas (ADAM) (Alfandari y col., 2001; Alfandari y col., 2018). Las MMP son endopeptidasas que degradan las proteínas de la MEC y están involucradas en el procesamiento de moléculas tales como receptores de superficie celular. Las ADAM en cambio son glicoproteínas unidas a la superficie celular que remodelan la MEC y participan en la adhesión célula-célula escindiendo proteínas de transmembrana. Algunos

autores plantean que ADAM13 es necesaria para la migración de la CN (Alfandari y col., 2001). La degradación de la MEC es un punto crucial en la cual se liberan factores de crecimiento y moléculas de señalización. De hecho las señales positivas involucradas en la migración de la CNC son FGF, VEGF, PDGF y Sdf-1, moléculas que interactúan directamente con la fibronectina (Pelletier y col., 2000; Martino y Hubbell, 2010). La MMP2, que es expresada en las células de CNC de *X. laevis* (Tomlinson y col., 2009), puede clivar e inactivar a Sdf-1 (McQuibban y col., 2001). Por lo tanto, se cree que las células de la CN digieren al Sdf-1 a medida que migran, creando así un gradiente frente a ellas. Por otro lado, PDGF estimula la expresión de MMP (Robbins y col., 1999).

1.2.5 Adhesiones focales durante la migración celular

Una vez que las células se encuentran polarizadas durante la migración, cuando las protrusiones se extienden, los receptores de adhesión tales como las integrinas o sindecanos entran en contacto con ligandos presentes en la matriz extracelular, promoviendo la activación de una cascada intracelular que permite el reclutamiento de proteínas adaptadoras que se unen con elementos del citoesqueleto de actina (Parri y Chiarugi, 2010).

La CNC de *Xenopus* se caracteriza por expresar las subunidades de integrinas $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV y $\beta 1$ (McKeown y col., 2013). Estos receptores se unen a proteínas y péptidos de la MEC, como por ejemplo fibronectina (Ivaska y col., 2012), la cual fue estudiada en el transcurso de esta tesis. Cuando la adhesión comienza a formarse, en primer lugar se conoce como “adhesión naciente”. Este tipo de adhesiones se forman justo detrás del borde director de células migratorias, y madurarán para convertirse en “complejos focales” y finalmente en “adhesiones focales”.

Ensamblaje de la adhesión focal durante la migración celular

Con respecto a las adhesiones nacientes, éstas son las más pequeñas de todos los tipos de adhesión célula-matriz, y son las primeras en formarse al contactarse la membrana celular con la MEC. Su ensamblaje es independiente de la actividad de la miosina II pero requiere la polimerización de actina mediada por el complejo Arp2/3 (Choi y col., 2008; Alexandrova y col., 2008). Específicamente en el frente de la célula, Rac1 y Cdc42 serían las proteínas reguladoras del reordenamiento del citoesqueleto de actina (Fig. 3), incluida la rápida polimerización de actina, lo que conduce a la formación de protuberancias de membrana como filopodios y lamelipodios, y simultáneamente estaría promoviendo el acoplamiento de las integrinas con la MEC (Kurokawa y col., 2005; Etienne-Manneville y col., 2002).

El compromiso de las integrinas con la MEC sería clave para la activación de Cdc42 y Rac1 a través de proteínas adaptadoras como talina y paxilina. La incorporación de esas proteínas es independiente de la actividad de la miosina II, mientras que la incorporación de otras proteínas de unión a la actina, como zyxina, α -actinina (Fig. 4) o las Tyr quinasas como la “quinasa de adhesión focal” (FAK), dependen de la actividad de la miosina II (Choi y col., 2008; Etienne-Manneville y col., 2002). Varios estudios postulan que estas proteínas adaptadoras están asociadas a otras proteínas de señalización, por ejemplo factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) como SCRIB y β -PIX o proteínas reguladoras de polaridad como Par3 y TIAM1, además de las quinasas intracelulares como FAK y Src, las cuales se encuentran ampliamente descritas (Etienne-Manneville y col., 2002; Pegtel y col., 2007).

Según el tipo de célula, mientras que el borde de ataque de una célula migratoria avanza, las adherencias nacientes se alargan y crecen, o bien se desensamblan. El desensamblaje ocurre cuando las adhesiones nacientes se encuentran con la zona de actina despolimerizada en el borde posterior del lamelipodio [Ridley y col., 2003]. Por lo tanto, el recambio de las adhesiones en esta región coincide con el desmontaje de las estructuras ramificadas de actina y con el desensamblaje de los

microtúbulos, mientras que las adhesiones nacientes también pueden madurar a complejos focales con pausas periódicas u ocasionales del movimiento de avance del borde de ataque. Estas pausas se correlacionan y dependen de los eventos contráctiles dependientes de la Miosina II (Ridley y col., 2003).

Maduración de la adhesión focal durante la migración celular

Las adhesiones nacientes maduran a complejos focales (CF) los cuales residen un poco más atrás del borde director (Fig. 4), en el borde posterior del lamelipodio. Son de mayor tamaño que las adhesiones nacientes y persisten durante varios minutos (Zimmerman y col., 2004; Ezratty y col., 2005; Sun y col., 2016). A medida que continúa el ciclo de migración, los complejos focales pueden madurar hasta convertirse en adhesiones focales (AF) más grandes y alargadas que residen al final de los grandes haces de actina (Fig. 4) o también llamadas "fibras de estrés", que se extienden en el cuerpo celular, justo en el borde posterior (Nobes y Hall, 1995; Burridge y Guilluy, 2016; Sun y col., 2016). Recientemente, se ha demostrado que un aumento en la actividad de la miosina II modifica la composición de los sitios de adhesión de las integrinas. De hecho, el aumento de la contractilidad da como resultado la regulación descendente de los componentes río abajo de las vías de activación de Rac1, lo que permite el cambio en el comportamiento de las adhesiones de la MEC de una etapa de ensamblaje a una de maduración y/o desensamblaje (Kuo y col., 2011). Sin embargo, los diferentes tipos de adhesión están mal definidos y, a menudo, es difícil distinguir un tipo de otro. En general, las AF dependen de la actividad de RhoA, mientras que los CF dependen de Rac1 o Cdc42 activos (Tapon y Hall, 1997; Tamar y Schlaepfer, 2009). Usando un enfoque proteómico, algunos autores describieron que las integrinas $\beta 1$ y αv cooperan para activar a RhoA durante la adhesión a la fibronectina, pero río abajo de RhoA las vías divergieron (Schiller y col., 2013). Inesperadamente, las integrinas $\beta 1$ se acoplan a ROCK, lo que conduce a la activación de la miosina II, mientras que las αv activa a la formina mDia1 (efector de Rho que juega un papel crucial en la formación de

fibras de estrés y filopodios). Sin embargo, en respuesta a la actividad de la miosina II y a la alta tensión, la integrina αV se recluta junto con mDia1 a las adhesiones, lo que concluye que la cooperación entre estas integrinas de unión a fibronectina y la vía de señalización de RhoA contribuyen fuertemente a la maduración de las adhesiones (Schiller y col., 2013).

Otra proteína, como la proteína de reticulación de actina, α -actinina, también se ha implicado como un componente crucial de la maduración, ya que es el componente más temprano detectado en la maduración de las adhesiones y se asocia con los filamentos de actina antes que otros componentes de la adhesión. De hecho, cuando las células experimentan estiramiento cíclico, las proteínas de unión a actina como la zixinas, se desplazan desde las zonas de tensión de las AF dentro de las fibras de estrés y desencadenan el reclutamiento local de α -actinina que espesan y refuerzan las fibras de estrés (Yoshigi y col., 2005; Colombelli y col., 2009; Smith y col., 2010).

Desensamblaje de la adhesión focal durante la migración celular

Si bien se sabe mucho sobre la maduración de las AF dependiente de la miosina II, aún falta esclarecer qué desencadena su cambio de un sitio de adhesión que se renueva continuamente a uno que se desensambla para permitir el movimiento celular.

El citoesqueleto de actina está constantemente sometido a ciclos de ensamblaje y desensamblaje dinámicos durante la exploración que realiza la célula sobre la MEC, lo que regula la formación de protuberancias, el ensamblaje/desensamblaje de la AF y la organización del filamento contráctil. Por lo tanto, la alteración del citoesqueleto de actina inhibe la migración y adhesión celular (Pollard y Cooper, 2009; Gerthoffer, 2008; Cleary y col., 2014).

Dado que el citoesqueleto de actina forma el andamiaje intracelular para los sitios de adhesión dependientes de integrina, se podría argumentar que la concentración

local de actina globular (monómero de actina), así como la relación entre la actividad Rac1 y RhoA, controlan el ensamblaje y el desensamblaje de las AF, respectivamente. Además del andamiaje de actina, el entorno local de la membrana celular regula el crecimiento y la estabilidad de los grupos de integrinas al modificar el reclutamiento de proteínas adaptadoras como talina, vinculina, FAK, kindlina e ILK (Böttcher y col., 2017; Fig. 4). Además de estas proteínas adaptadoras, se ha descrito que se requiere un aumento del nivel de PIP2 para el desensamblaje eficaz de las AF mediado por clatrina, posterior al tratamiento con Nocodazol (Chetrit y col., 2009; Ezratty y col., 2009; Chao y col., 2010). Los niveles altos de PIP2 también aumentan el reclutamiento de proteínas adaptadoras de unión a integrinas como Numb y Dab2, que vinculan a las integrinas con la maquinaria endocítica (Kuo y col., 2011; Chao y col., 2009).

Otros componentes que desencadenan el desensamblaje de las AF maduras en la parte posterior de la célula son los microtúbulos. El tratamiento de las células con la droga depolimerizante de microtúbulos Nocodazol da como resultado la acumulación de integrinas en AF maduras, que es reversible después de la eliminación del Nocodazol. Los microtúbulos dinámicos se dirigen de forma recurrente a las AF maduras, que se desensamblan en la parte posterior de la célula, al interactuar con las proteínas de seguimiento del extremo + del microtúbulo, como por ejemplo EB1 (Stehbens y Wittmann, 2012). La polarización de la red de microtúbulos facilita el tráfico de vesículas que contienen integrinas y otras moléculas en el frente migratorio, para promover la formación de las protrusiones y el ensamblaje de los contactos focales (Etienne-Manneville, 2013). Por otro lado, los microtúbulos polarizados también pueden ayudar al desensamblaje de la AF madura en la parte trasera de la célula mediante el transporte de moléculas como la dinamina (Stehbens y Wittmann, 2012; Etienne-Manneville, 2013; Yue y col., 2014). La dinamina se localiza en los contactos focales y es requerida para este proceso en las células migratorias, probablemente al promover la internalización de los complejos de integrina (Shpetner y Vallee, 1992; Etienne-Manneville, 2013; Yue y col., 2014).

Otros estudios concluyen que el desensamblaje de las AF se caracteriza por un desequilibrio entre la tensión y las estructuras de adhesión dependientes de integrinas a través de la acción de la miosina II (Ezratty y col., 2005), la dinamina y FAK (Crowley y Horwitz, 1995). Además, el reclutamiento de Calpaína 2, a través de la actividad de miosina II para escindir talina y FAK, aumenta la renovación de las adhesiones dependientes de integrina (Franco y col., 2004; Franco y Huttenlocher, 2005).

Por otro lado, FAK coopera y se asocia con la tirosina quinasa Src, para aumentar el recambio y la señalización de las adhesiones dependientes de integrinas. También se cree que otras proteínas como Prickle1 (Lim y col., 2016), Gai2 y β -PIX (Ward y col., 2016) participan durante este proceso, y varios de los mecanismos que controlan el recambio de la AF coinciden en que Prickle1, en particular, puede promover el desmontaje del contacto focal. Prickle1 es una proteína que participa en la extensión convergente y la migración celular (Lim y col., 2016), y de hecho en las células MKN1 de cáncer gástrico, Prickle1 se acumula en los contactos focales asociándose a la paxilina en el sitio de retracción celular, mejorando el desensamblaje de la AF dependiente de los microtúbulos (Lim y col., 2016). Por otro lado, los microtúbulos pueden promover el suministro de vesículas de membrana que son esenciales para la formación de una protrusión celular. Además, los microtúbulos pueden entregar endosomas de reciclaje que transportan moléculas de señalización asociadas a la membrana, como Rac1, Cdc42 y β -PIX (Palamidessi y col., 2008). Finalmente, para migrar las células requieren varios mecanismos de recambio de la AF. Algunos autores han descrito que los cambios en la dinámica de los microtúbulos influyen en la rotación y distribución de las AF y en la localización y actividad de las GTPasas de la familia Rho (Etienne-Manneville, 2013), pero en el marco de estos resultados, varios puntos importantes permanecen aún sin aclararse.

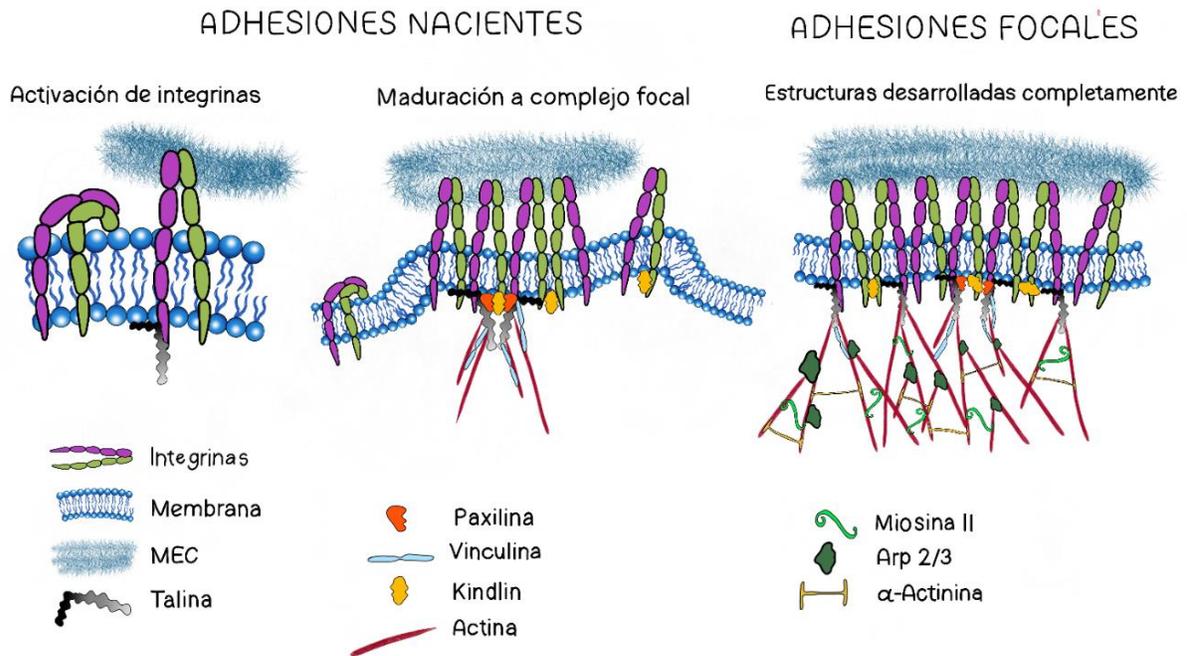


Figura 4. Formación y maduración de la adhesión focal. La formación de estructuras de adhesión célula-matriz requiere de la activación de los receptores de la MEC llamados integrinas formando las adhesiones nacientes (izquierda), activación que induce la agrupación macromolecular de algunas proteínas adaptadoras que permiten la maduración a complejo focal (centro), que al madurar se convierten en adhesiones focales propiamente tal (derecha). Los actores moleculares claves en este proceso se representan esquemáticamente en la figura (Adaptado de Henning Stumpf y col., 2020)

2. Estructura y función de los Microtúbulos durante la migración celular

Los microtúbulos (MTs) son uno de los tres tipos principales de redes de citoesqueleto en las células, junto con los microfilamentos de actina y filamentos intermedios. Los MTs dan forma y estructura a la célula y forman el huso mitótico, permitiendo la segregación de los cromosomas durante la división celular. Son importantes en muchos procesos celulares dinámicos, como por ejemplo regulando el tráfico celular, la maquinaria de adhesión célula-célula y célula-sustrato, contribuyendo así a la polarización y migración celular.

2.1 Estructura de los microtúbulos

Los MTs son una combinación de monómeros de α y β tubulina (Fig. 5), los cuales forman dímeros de α -tubulina y β -tubulina que se polimerizan de cabeza a cola en protofilamentos lineales. Los protofilamentos se asocian lateralmente entre sí para formar tubos huecos, los cuales se conocen como MTs.

Los dímeros α - β tubulina son asimétricos y forman MTs asimétricos, ya que estos últimos poseen un extremo "más" y un extremo "menos". La α tubulina de cada protofilamento está mirando hacia la terminación menos, mientras que la β tubulina se encuentra mirando hacia el extremo más. El extremo menos tiene una dinámica mucho más lenta que el extremo más y, a menudo, se encuentra anclado al centrosoma u otro centro organizador de MTs.

El centrosoma está formado por dos centriolos y se encuentra rodeado de proteínas específicas para la nucleación y anclaje de los MTs (Bornens y col., 1987). Estas proteínas centrosómicas juegan un papel fundamental en la organización radial de los MTs, ya que al interferir con el transporte de ellas hacia el centrosoma se pierde la integridad del centrosoma (Quintyne y col., 1999; Dammermann y Merdes, 2002). Sin embargo, aún cuando el centrosoma se pueda romper, esto no necesariamente podría afectar la nucleación de los MTs (Quintyne y col., 1999; Dammermann y Merdes, 2002). De hecho, en algunos tipos de células los extremos menos de los MTs no están asociados con el centrosoma. Esto puede ser causado por la ruptura de los MTs (Waterman-Storer y Salmon, 1997; Odde y col., 1999), liberación del centrosoma (Keating y col., 1997) o a su ensamblaje al complejo de Golgi (Efimov y col., 2008). Por ejemplo, durante la migración de células pulmonares de tritón, hasta el 90% de sus MTs se encuentran separados del centrosoma (Waterman-Storer y Salmon, 1997). Asimismo, los MTs axonales en las neuronas no se encuentran anclados al centrosoma (Baas y Ahmad, 1992) y los extremos menos permanecen estáticos ya que están limitados por factores especializados como γ -tubulina y Nezhha (Meng y col., 2008). Por otro lado, los MTs son altamente

dinámicos, existiendo una constante polimerización y depolimerización, condición denominada inestabilidad dinámica, la cual se describirá a continuación.

2.2 Inestabilidad dinámica de los microtúbulos

La inestabilidad dinámica permite que la matriz de MTs “escanee” continuamente el espacio tridimensional de la célula y pueda así adaptarse rápidamente a diferentes estímulos (Kirschner y Mitchison, 1986). Cada dímero de α - β tubulina es capaz de unirse a dos moléculas de GTP (Galjart, 2010). Un GTP se une a la α tubulina y no es intercambiable; mientras que el otro GTP se une a un sitio intercambiable de β -tubulina. Algunos autores plantean que la incorporación del dímero de tubulina en el MT en crecimiento desencadena la hidrólisis de GTP a GDP (nucleótido unido a β tubulina). Por lo tanto, la β tubulina a lo largo del MT está ligado a GDP, mientras que el extremo “más” que se encuentra en crecimiento está polimerizado por dímeros que contienen β tubulina unida a GTP (Carlier y Pantaloni, 1982) (Figura 5, izquierda).

La tubulina unida a GTP es recta y por lo tanto permite la polimerización del MT, generando una estructura denominada “GTP-cap”, y es más energéticamente favorable que la tubulina unida a GDP que adopta una conformación curva. El “GTP cap” de la tubulina, que también forma fuertes enlaces laterales, es importante en la prevención de la despolimerización de los MTs. Sin este “cap”, los protofilamentos tienden a curvarse y despegarse entre ellos, provocando que los enlaces se rompan y desencadenando lo que se conoce como la “catástrofe de los MTs” (Figura 5, derecha). Todavía no hay consenso sobre el tamaño o la función precisa del “GTP cap”, sin embargo los protofilamentos dentro de un MT pueden contener una cantidad variable de GTP unido a la tubulina en el extremo “más”, mientras que los protofilamentos individuales pueden acortarse cuando el MT está en fase de crecimiento (Schek lli y col., 2007). No obstante, el límite de GTP parece ser importante en la regulación de la inestabilidad dinámica de los MTs.

Polimerización de los microtúbulos

Catástrofe de los microtúbulos

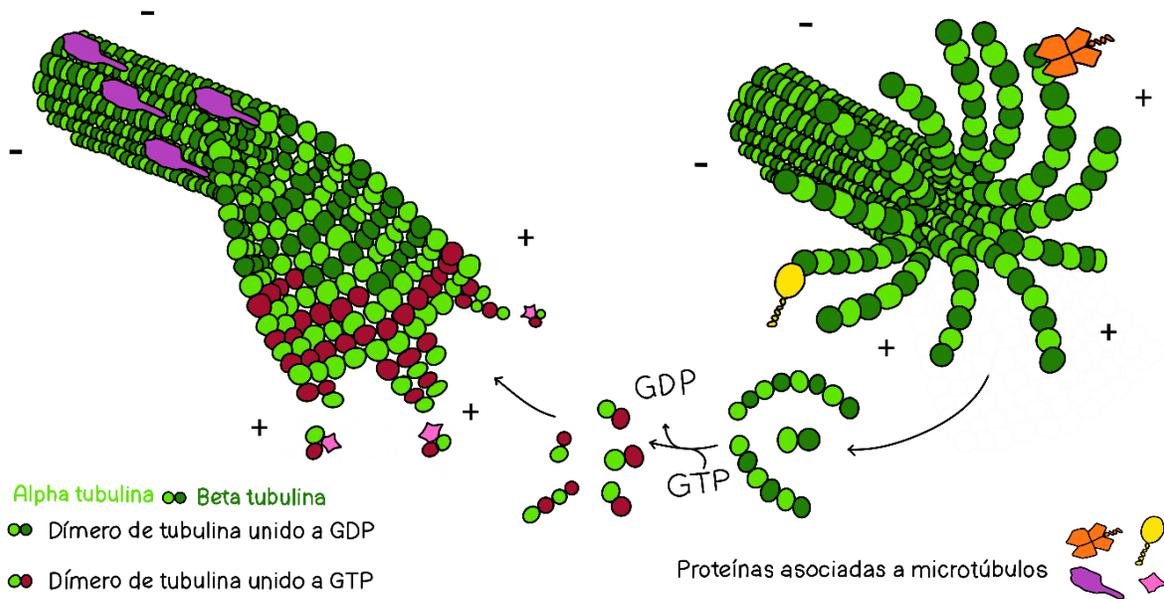


Figura 5. Dinámica de los MTs. El extremo + de los MTs está en estado de inestabilidad dinámica. Los dímeros de tubulina son adheridos al extremo + de los MTs durante las fases de crecimiento y GTP es hidrolizado a GDP. Los dímeros de tubulina liberados desde el MT durante la catástrofe lleva a perder el GTP cap y los protofilamentos “se pelan como cáscara de banana”. Los MTs que están sometidos a catástrofe pueden ser rescatados y recomenzar la fase de crecimiento. Las proteínas asociadas a MTs se pueden encontrar en los extremos + entre las fases de crecimiento y de acortamiento, unidas a dímeros de tubulina y asociadas al eje de los MTs (Adaptado de Conde y Cáceres, 2009).

2.3 Dinámica de los microtúbulos

Los MTs forman una matriz altamente dinámica y en constante cambio que se extiende por toda la célula y puede reaccionar rápidamente a los estímulos (Figura 6). La inestabilidad dinámica está particularmente ligada funcionalmente a la reestructuración y el autoensamblaje de la red de MTs, pero el alto grado de rigidez de los MTs tendería a limitar dicha plasticidad de la red (Brangwynne y col., 2007). Para que la matriz de MTs explore la célula, los MTs deben crecer a lo largo de una variedad de caminos en lugar de crecer repetidamente a lo largo del mismo camino recto. De hecho, los MTs fijos son curvos (Brangwynne y col., 2007), y los extremos

en crecimiento de los MTs son más flexibles que la región central (Kurachi y col., 1995; Janson y Dogterom, 2004).

Durante el crecimiento de los MTs, las fuerzas intracelulares provocan fluctuaciones en la orientación de los MTs en crecimiento, curvando su trayectoria de crecimiento (Brangwynne y col., 2007). Los MTs con frecuencia cambian su dirección de crecimiento, lo que sugiere que su trayectoria de crecimiento es persistentemente aleatoria (Brangwynne y col., 2007). Una vez que el MT ha crecido, la curva resultante es estabilizada por la red celular elástica circundante (Brangwynne y col., 2007). Por lo tanto, los MTs son rígidos y reforzados por la red que los rodea, pero al mismo tiempo son deformables durante el crecimiento (Brangwynne y col., 2007). La dinámica de los MTs es fundamental para sus funciones biológicas y es diferente dependiendo del tipo de célula en la cual estén contenidos: por ejemplo, los MTs son menos dinámicos en células epiteliales que en fibroblastos (Wadsworth y McGrail, 1990).

La dinámica de los MTs puede reflejar la estabilidad relativa de los componentes de las células que se encuentran diferenciadas y polarizadas. Por ejemplo, las células endoteliales humanas cultivadas en monocapa tienen un promedio más bajo en la tasa de crecimiento de MTs que las células individuales, esto debido a que las células individuales tienen un subgrupo de MTs que crecen particularmente rápido (Alieva y col., 2010), lo que ilustra que la dinámica de los MTs puede verse afectada por el entorno extracelular. Las células epiteliales y los fibroblastos que migran direccionalmente hacia una herida tienen un mayor número de MTs en crecimiento por unidad de área en los sitios de contacto célula-célula, que incluso en el borde director (Salaycik y col., 2005), lo que demuestra que la dinámica de los MTs se puede regular de manera diferente en diferentes partes de la célula y que esto también puede estar influenciado por factores extracelulares, tales como los contactos célula-célula y/o la polaridad celular (Moore y col., 2013).

También se sabe que se producen varias modificaciones postraduccionales en la tubulina, por lo general cuando ésta se polimeriza. De hecho, se sabe que los MTs

estables en particular parecen acumular una gran variedad de modificaciones postraduccionales (Hammond y col., 2008):

Los MTs pueden ser modificados covalentemente por una carboxipeptidasa que elimina el Residuo Tyr que se encuentra en el C-terminal de la α -tubulina durante la polimerización (ya que sólo la α tubulina que se ha incorporado a la red de MTs puede sufrir destirosinación), y luego a través de una ligasa, se liga nuevamente la Tyr de la tubulina pero ahora durante el proceso de despolimerización (Hammond y col., 2008). Es por esta razón que los MTs destirosinados se consideran más estables que los MTs tirosinados (Schulze y col., 1987). Al respecto, se ha observado que la destirosinación en fibroblastos inhibe el desensamblaje de los MTs (Peris y col., 2009), y en presencia de bajas concentraciones de Nocodazol (droga depolimerizante de MTs) se ha observado gran cantidad de MTs tirosinados (Conde y Cáceres, 2009). Sin embargo, la estabilización de los MTs parece inducir la destirosinación, que por lo tanto se considera más como una consecuencia que una causa de la estabilización de los MTs (Khawaja y col., 1988). Asimismo, la acetilación de una lisina en la α tubulina dentro de los MTs también se asocia con estabilidad de los MTs. La acetilación de los MTs se correlaciona bien con una vida media más larga pero, al igual que con la destirosinación, se cree que la acetilación es una consecuencia más que una causa de la estabilidad de los MTs (Hammond y col., 2008). Por cierto, se ha encontrado que los MTs acetilados y destirosinados son más frecuentes en los axones de las neuronas que en sus dendritas, a pesar de que los MTs en los axones y las dendritas tienen características similares de estabilidad (Hammond y col., 2010). Esta característica podría deberse a diferencias en la localización de enzimas responsables de las modificaciones postraduccionales e ilustra que las modificaciones postraduccionales pueden dar lugar a algún tipo de diferenciación del citoesqueleto subcelular. Aunque se piensa que las modificaciones postraduccionales son más una consecuencia que la causa de la estabilidad de los MTs, es concebible que tengan alguna función. De hecho, algunos hallazgos en que las alteraciones en el equilibrio entre tubulina tirosinada y destirosinada puede afectar el crecimiento tumoral respaldan los antecedentes anteriormente mencionados (Mialhe y col., 2001), ya que desorganiza los circuitos

neuronales (Erck y col., 2005) y puede provocar anomalías en la morfogénesis y la polaridad celular (Peris y col., 2006).

2.4 Proteínas asociadas a microtúbulos

La dinámica de los MTs es un componente fundamental de la interacción entre este componente del citoesqueleto y el resto de la célula, lo cual es apoyado por experimentos que muestran que incluso una supresión leve de la dinámica de los MTs por dosis bajas de drogas estabilizantes o desestabilizantes de los MTs, pueden tener un efecto desproporcionado en la organización del huso mitótico y en la migración direccional (Jaworski y col., 2009; Liao y col., 1995). Por lo tanto, la dinámica de los MTs está estrictamente regulada y el control es ejercido en varios niveles para que los procesos celulares ocurran de manera adecuada. Por ejemplo, aumentar o disminuir la reserva de tubulina libre puede cambiar la tasa de crecimiento de los MTs y la frecuencia de las catástrofes. La dinámica de los MTs también está influenciada por las interacciones con una gran cantidad de proteínas asociadas a MTs (MAP), incluidas las proteínas que promueven el ensamblaje de MTs, proteínas estabilizadoras o desestabilizadoras de MTs, proteínas que cortan MTs y proteínas motoras de los MTs. Por lo tanto, las MAP pueden regular la dinámica de los MTs de manera espacial y temporal al influir en los dímeros de tubulina, la red de MTs y/o los extremos de los MTs.

2.4.1 Proteínas de seguimiento del extremo más (+TIPs)

Un subgrupo especializado de MAP son las proteínas de unión a extremo más (+TIP), que afectan la dinámica de los MTs cuando se acumulan en los extremos de crecimiento de los MTs. Desde la primera descripción de las +TIP, se han propuesto varias teorías con respecto a los mecanismos que conducen a la acumulación de estas proteínas en el extremo más. El primero de estos

mecanismos se denominó “treadmilling”, por el cual las +TIP se unen al MT en crecimiento y luego se disocian debido a las modificaciones o cambios conformacionales de estas proteínas, o bien debido a un cambio conformacional del MT (Pérez y col., 1999). Algunos autores han demostrado que existe una rápida asociación y disociación de las +TIPs con los extremos de los MTs a través de ensayos de molécula única *in vitro* (Bieling y col., 2007) y mediante mediciones rápidas de FRAP en células vivas (Dragestein y col., 2008).

El aumento de la concentración de tubulina libre *in vitro* aumenta la tasa de crecimiento de los MTs sin aumentar la asociación de las +TIP, mientras que la disociación de las +TIP parece ser el factor limitante en la velocidad de unión al extremo más de los MTs. Estos resultados, que no respaldan la idea del “treadmilling”, llevaron al desarrollo del modelo de “intercambio rápido”. En este modelo, la polimerización de los MTs proporciona una gran cantidad de sitios de unión en el extremo más para las +TIP. Cada sitio de unión se uniría y se disociaría varias veces con las +TIP, y luego, los sitios de unión desaparecerían exponencialmente a medida que los MTs siguen polimerizando. Una explicación probable para la presencia y luego la desaparición de estos sitios de unión al extremo más del MT, es una diferencia estructural entre el extremo y el resto del MT. El candidato más obvio para esto es el “GTP cap”; sin embargo, las +TIP se acumulan en una extensión de hasta 2 μm del MT (Komarova y col., 2005). Esta distancia es más larga que la supuesta longitud del “GTP cap” que es de 320 nm (Zovko y col., 2008), y también indica que las +TIP no sólo interactúan con el extremo más del MT, sino también lateralmente; de hecho, hoy en día se sabe que es más probable que ocurran interacciones laterales que interacciones con el “GTP cap” (Galjart y col., 2010).

Hay muchas +TIP diferentes que se unen a los extremos más de los MTs en crecimiento. Ellas tienen tasas variables de recambio en los extremos de los MTs, dominios de unión diferentes a los MTs y mecanismos diferentes de reconocimiento de los extremos de los MTs, en base a los cuales han sido vagamente clasificados. Las +TIP marcadas con fluorescencia se utilizan para rastrear los extremos

crecientes de los MTs, un proceso conocido como “plus-end tracking” (Perez y col., 1999; Stepanova y col., 2003; Salaycik y col., 2005), del cual hablaremos ampliamente en esta tesis.

La primera +TIP utilizada para este propósito fue una forma de CLIP-170 (“cytoplasmic linker protein 170” o proteína de unión citoplasmática 170), marcada con proteína fluorescente verde (GFP) (Perez y col., 1999). En experimentos de “time-lapse”, la proteína fluorescente se observó similar a un “cometa”, los cuales se mueven por toda la célula. Es importante señalar que las +TIP se unen y se disocian muy rápidamente de los extremos más de los MTs. Como el extremo más de los MTs se mueve a través del citoplasma, las +TIP se inmovilizan transitoriamente en el extremo de crecimiento de los MTs y en realidad no se mueven, por lo tanto, el cometa es sólo una ilusión óptica.

Anteriormente, la dinámica de los MTs se observaba utilizando tubulina marcada con fluorescencia, pero la alta densidad de MTs en la célula sólo permitía el análisis en la periferia. Por lo tanto, la obtención de imágenes a través del seguimiento de cometas de +TIP tiene la ventaja de proporcionar mucha más información sobre el crecimiento de MTs dentro de la célula. Sin embargo, lo que podría ser una desventaja inherente de rastrear los MTs a través de los cometas +TIP es que estas proteínas sólo se unen a los MTs que se encuentran en crecimiento. No obstante, y gracias a herramientas bioinformáticas, hoy en día las fases de pausa y contracción de los MTs pueden ser obtenidas a partir de las trayectorias de crecimiento: por ejemplo, el crecimiento de dos MTs que corren a lo largo de la misma “pista” y están separados por un corto período de tiempo son probablemente el mismo MT (Applegate y col., 2011). Al vincular tal información se pueden inferir detalles de las fases de crecimiento, detalles sobre la contracción y la pausa (Matov y col., 2010; Applegate y col., 2011).

2.4.2 Proteínas EB, “end binding protein”

Otras proteínas que han sido ampliamente utilizadas para el seguimiento de la curva de crecimiento del extremo más de los MTs, son las proteínas EB (“end binding protein” o proteína de unión a extremo) marcadas con fluorescencia, que hasta la fecha tres han sido descritas (Roth y col., 2019). Al igual que CLIP-170, estas tres proteínas EB (EB1, EB2 y EB3) son dímeros pequeños y cada monómero contiene dominios de homología de calponina (CH), los cuales son necesarios y suficientes para reconocer los extremos de los MTs en crecimiento (Honnappa y col., 2005; Slep y col., 2005). Este dominio CH se encuentra típicamente en proteínas de señalización y proteínas de unión a actina (Gimona y col., 2002).

Al igual que otros +TIP, se ha demostrado que las proteínas EB controlan el comportamiento de los MTs, influyendo en la dinámica, la estabilidad y la nucleación de los MTs. EB3 se encuentra altamente expresada en neuronas y miocitos y es importante en la diferenciación de los miotubos y desarrollo neuronal (Straube y Merdes, 2007; Jaworski y col., 2009). Por otro lado, los miembros de la familia EB1 se encuentran bien conservados en plantas, levaduras y mamíferos (Tirnauer y Bierer, 2000). Específicamente las proteínas EB1 en algunas levaduras y algunos vertebrados reducen la frecuencia de catástrofes; sin embargo, en *D. melanogaster* se ha encontrado que la presencia de EB1 aumenta la frecuencia de catástrofes (Rogers y col., 2002; Tirnauer y col., 1999), lo que resulta contradictorio en la búsqueda del papel que estarían cumpliendo las proteínas EB en la dinámica de los MTs.

Aún cuando las proteínas EB se asocian autónomamente con factores reguladores de MTs en crecimiento y también interactúan con otras +TIP (revisado en Bieling y col., 2007; Lansbergen y Akhmanova, 2006), la expresión ectópica de proteínas EB fluorescentes (o de CLIP-170) a niveles que permiten su observación y seguimiento de los extremos más de los MTs, no parecen afectar la dinámica de los MTs, al menos no en comparación con la dinámica de los MTs en células que expresan tubulina fluorescente (Komarova y col., 2002), por lo tanto pueden ser ampliamente utilizadas para estudiar la dinámica de los MTs en diferentes contextos celulares.

2.4.3 +TIPs y la dinámica de los microtúbulos dentro de la célula

Algunos estudios sugieren que los MTs dinámicos son los encargados de “explorar el espacio citoplasmático de la célula” para luego ser estabilizados selectivamente en ciertos sitios, como por ejemplo en la corteza celular (Gundersen, 2002; Gundersen y Bretscher, 2003). Esta estabilización momentánea de los MTs permitiría facilitar el transporte de vesículas, o también durante la división celular facilitar la separación de los cromosomas para generar las células hijas. La unión de las +TIPs a los extremos más de los MTs, las ubica en una posición estratégica para regular las interacciones entre la tubulina y otras proteínas intracelulares, generando en la corteza celular fuerzas de empuje o tracción a través de la polimerización y despolimerización de la red de MTs, respectivamente (Inoue y Salmon, 1995), lo que empuja vesículas, membrana celular y centrosomas (Dogterom y col., 2005). La proteína motora dineína se une a los MTs en dirección al extremo menos (transporte retrógrado), ejerciendo una fuerza de tracción sobre la red de MTs, lo que podría traducirse en un aumento en la fuerza de tracción de la corteza celular. Esto, sin embargo, aún no está del todo claro (revisado de Dujardin y Vallee, 2002). Por otro lado, la kinesina se desplaza por el MT en dirección al extremo +, por lo que realiza el transporte anterógrado en dirección a la membrana plasmática.

Algunas +TIPs que regulan a la dineína, como por ejemplo CLIP-170, se unen en el extremo más de los MTs. APC por su parte, que es transportada por la kinesina hacia el extremo más de los MTs, es capaz de promover la polimerización de la tubulina, anclando los MTs a la corteza celular (Nakamura y col., 2001; Zumbunn y col., 2001; Reilein y Nelson, 2005), interaccionando con proteínas de unión a actina (Wen y col., 2004). CLASP (“CLIP-asociating protein” o proteína asociada a CLIP), en cambio, se encuentra en la corteza celular independiente de los MTs, para luego unir los MTs por el extremo más a la corteza celular, estabilizándolos y con ello impidiendo su despolimerización (Mimori-Kiyosue y col., 2005). Se ha visto que algunas +TIPs se pueden unir a la actina, como por ejemplo CLIP-170, la cual es

capaz de interactuar con proteínas de unión a actina en los extremos + de los MTs (Fukata y col., 2003), e incluso también se ha visto que se pueden unir a AF y adhesiones célula-célula, lo que podría establecer la entrega dirigida de vesículas con diferentes proteínas celulares a ciertas secciones de la célula. Por ejemplo, las kinesinas son proteínas motoras necesarias para modular la dinámica de las AF en fibroblastos, a través de la unión a MTs más dinámicos en el extremo más, probablemente modulando la entrega de componentes que controlan el recambio de la adhesión celular (Krylyshkina y col., 2002).

2.5 Microtúbulos y su relación con las adhesiones focales

Los MTs influyen en la formación de lamelipodios y filopodios durante la migración celular. También influyen en la contractilidad a través de la activación de las proteínas G pequeñas de la familia Rho.

La polimerización de los MTs en el borde director de la célula es un mecanismo que promueve la formación de lamelipodios dependientes de Rac1, mientras que la despolimerización de los MTs promueve la contracción de actomiosina dependiente de RhoA en la parte posterior de la célula (Enomoto, 1996; Amano y col., 1997). La polimerización de los MTs favorece el desensamblaje de las AF, mientras que la despolimerización de los MTs aumenta la contractilidad celular, la formación de fibras de estrés y con ello la estabilización de las AF (Bershadsky y col., 1996).

La función de los MTs durante la migración no constituye una regla inviolable, ya que cada tipo celular contempla un comportamiento de la tubulina diferente, lo que hace que este componente del citoesqueleto sea mucho más interesante al momento de estudiar la migración celular. Por ejemplo, los fibroblastos que se cultivan en matrices 2D no requieren MTs para la extensión de sus lamelipodios, sin embargo, no pueden polarizarse sin la presencia de los MTs (Rhee y col., 2007). Cuando los fibroblastos migran en 3D, estos carecen de fibras de estrés y AF, y si son depletados de MTs no son capaces de formar protrusiones salientes,

impidiendo su migración. Así, en ausencia de fibras de estrés y AF, los fibroblastos requieren de los MTs para formar protrusiones (Rhee y col., 2007). Por otro lado, cuando se tratan embriones de *D. rerio* con Nocodazol, rápidamente se interfiere con la migración direccional de los macrófagos y, por lo tanto no hay cierre de herida (Redd y col., 2006). En este mismo contexto, el inhibidor de ROCK, Y-27632, es capaz de suprimir los efectos del Nocodazol en los macrófagos, reclutándolos para el cierre de heridas *in vivo*, destacando nuevamente que la despolimerización de los MTs puede activar RhoA (Redd y col., 2006). A su vez, es importante destacar que las AF también pueden influir en la polimerización de los MTs. De hecho aquellos MTs que se encuentran dirigidos hacia las AF, experimentan eventos rápidos de catástrofe y rescate (Kaverina y col., 1998; Efimov y col., 2008), fenómenos que parecen ser dependientes de la proteína paxilina (Efimov y col., 2008), lo que le permite a los MTs apuntar a las AF varias veces en cortos períodos de tiempo (Kaverina y col., 1998). Sin embargo, la unión de los MTs a las AF también puede estabilizar transitoriamente al MT, lo que sugiere que ocurre una breve fase de estabilización antes de la catástrofe dependiente de paxilina (Kaverina y col., 1998). Esto ilustra la complejidad del sistema: por ejemplo, los contactos célula-célula pueden afectar la estabilidad de las adhesiones célula-sustrato al afectar la estabilidad de los MTs, a su vez las adhesiones célula-sustrato pueden afectar la dinámica de los MTs (Moore y col., 2013).

2.6 Microtúbulos y su relación con las GTPasas de la familia Rho

Teniendo en cuenta los vínculos entre las proteínas G pequeñas de la familia Rho, los MTs, las AF, los contactos célula-célula y la polaridad, no sorprende que RhoA y los MTs hayan sido implicados en el proceso de Inhibición de la Locomoción por Contacto (CIL) (Fig. 6B). Por ejemplo, en fibroblastos embrionarios de *G. gallus*, los MTs aumentan la frecuencia de catástrofe y las tasas de contracción y crecimiento en el sitio de contacto célula-célula (Kadir y col., 2011) (fig. 6). Esta reorganización de la red de MTs es necesaria para mediar un CIL exitoso, y depende de la

señalización de Rho y ROCK. Inhibir ROCK conduce a un aumento de MTs destirosinados o acetilados, aumentando la persistencia de los MTs en los contactos célula-célula, lo que inhibe CIL (Kadir y col., 2011). La inhibición de ROCK también reduce la contractilidad de actomiosina y CIL, mientras que algunos autores plantean que interferir con la contractilidad de la miosina, no afecta significativamente a CIL (Kadir y col., 2011). Sin embargo, el Nocodazol podría rescatar parcialmente la pérdida de dinámica de los MTs y CIL, previamente causado por la inhibición de ROCK (Kadir y col., 2011), lo que sugiere que la activación de RhoA en los contactos célula-célula conduce a la despolimerización de los MTs y con ello un cambio en la polaridad de la matriz de MTs (Fig. 6B) (Moore y col., 2013). En células de la CN de *Xenopus*, RhoA también se activa en los contactos célula-célula durante el fenómeno de CIL (Carmona-Fontaine y col., 2008). Por otro lado, los MTs también pueden afectar a Rac1. De hecho, Rac1 se activa en el borde director de la célula a través de la penetración de los MTs en los lamelipodios y filopodios (Fig. 6A). Como Rac1 activa es capaz de unirse a dímeros de tubulina, pero no a MTs (Best y col., 1996), la polimerización de los MTs podría liberar Rac1 activa, lo que conduce a un aumento en la actividad de Rac1 de forma localizada (Waterman-Storer y col., 1999), lo que ha llevado a sugerir que los MTs están directamente involucrados en la polimerización de actina en el frente de la célula, induciendo la formación de lamelipodios (Etienne-Manneville, 2013). En cuanto a RhoA, la despolimerización de los MTs aumenta la actividad RhoA (Fig. 6B) (Bershadsky y col., 1996).

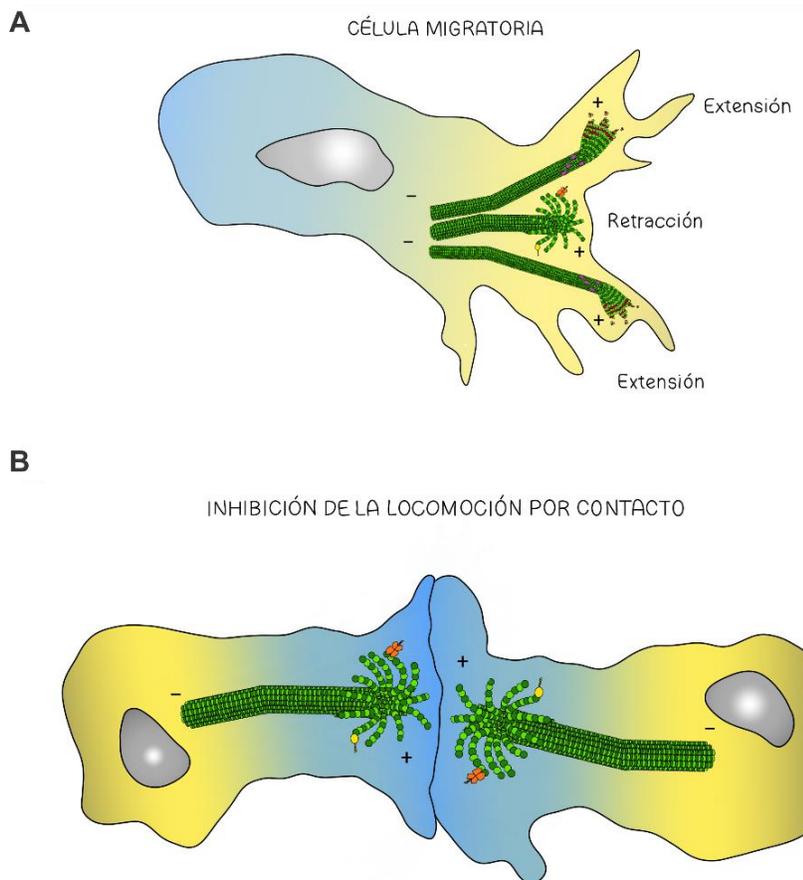


Figura 6. MTs durante la migración colectiva. Durante la migración celular colectiva los MTs experimentan fases de crecimiento (polimerización) y acortamiento (despolimerización), dependiendo del contexto en el cual se encuentren. (A) Cuando la célula extiende su protrusión, los MTs experimentan fases de polimerización, mientras que cuando hay retracción del cuerpo celular los MTs experimentan fases de despolimerización. (B) Cuando las células chocan entre ellas, colapsan sus protrusiones, y cambian la dirección de la migración. En este contexto, los MTs deben desensamblar rápidamente en el contacto célula-célula por lo que entran en catástrofe (Fuente: Etienne-Manneville, 2013; Moore y col., 2013).

Como hemos discutido hasta ahora, una célula migratoria necesita de procesos altamente dinámicos para permitir el desplazamiento direccionado y el cambio en la dirección de migración posterior a la inhibición de la locomoción por contacto. Estos procesos dinámicos involucran el citoesqueleto de actina, los MTs y las AF, todos ellos regulados por proteínas de la familia de las Rho GTPasas. Sin embargo, estas proteínas deben responder a señales río arriba, ya sea provenientes del medio

extracelular (matriz) o de otras células. Para esto, las células contienen sistemas de transducción de señales, entre los cuales y cumpliendo un rol muy importante en la migración celular, encontramos la señalización de las proteínas G heterotriméricas (Cotton y Claig, 2009).

3. Función de la Subunidad Gai2 en disitintos contextos celulares

3.1 Proteína G heterotrimérica

La proteína G heterotrimérica está constituida por las subunidad α , β , y γ . Esta proteína se encuentra acoplada a un receptor (GPCR), el cual propaga señales externas a través de múltiples complejos proteicos conocidos como efectores, los cuales amplifican la señal (Birnbauer, 2007). Cuando un receptor acoplado a proteína G (como CXCR4 o C3aR) une un ligando específico, ocurre un cambio conformacional en la porción intracelular de éste, lo que se traduce en el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$ de la proteína G, junto con la disociación del heterotrímero, liberando así a $G\beta\gamma$. Ambas especies activas ($G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$) son capaces de regular distintos efectores modulando así distintos procesos celulares, entre ellos, la migración celular (Goldsmith y Dhanasekaran., 2007).

Las subunidades $G\alpha$ en vertebrados suelen agruparse en cinco subfamilias ($G\alpha$ s/olf, $G\alpha$ q/11, $G\alpha$ 12/13, $G\alpha$ i/o/z y $G\alpha$ v), diferenciándose entre ellas en la identidad de su secuencia y su especificidad por proteínas efectoras (Oldham y Hamm, 2008; Oka y col., 2009). Aunque la activación canónica de la subunidad $G\alpha$ a través de los GPCR está bien establecida (Pierce y col., 2002), existen algunas proteínas que regulan la actividad de la proteína G heterotrimérica de forma independiente de receptor (Miller y col., 2000). Estas proteínas también conocidas como activadores de la señalización de proteínas G o AGS, se pueden clasificar en tres grupos: El primero, grupo I activa a la subunidad $G\alpha$, como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina no canónicos, el grupo II que posee un motivo GPR que

estabiliza a la conformación $G\alpha$ -GDP (Cismowski y col., 2001), mientras que el grupo III se une a $G\beta\gamma$ para disociarlo de la subunidad $G\alpha$ (Blumer y col., 2006).

3.2 Subunidad Gai

Gai es la familia más grande y diversa de subunidades $G\alpha$ e incluye a las subunidades Gai1, Gai2, Gai3, Gao, Gat, Gag y Gaz, todas ellas, a excepción de Gaz, son sensibles a la toxina pertussis (PTX) (Malbon, 2005). De esta familia se han descrito tres isoformas de Gai en mamíferos (Gai1, Gai2, Gai3), mejor conocidas como “las subunidades $G\alpha$ inhibitorias”, las cuales suprimen la actividad de la enzima adenilil ciclasa, lo que resulta en una disminución de los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc) (Wong y col., 1991; Xiao y col., 1999; Pines y col., 1986). A pesar de que las subunidades Gai se clasifican genéricamente por su capacidad para “inhibir la enzima adenilil ciclasa”, estas tres isoformas pueden tener otras funciones independientes de AMPc. Si bien todas ellas se encuentran preferentemente localizadas en la membrana plasmática y acopladas a un GPCR, algunos estudios de inmunofluorescencia y fraccionamiento celular han demostrado que existe una significativa fracción de proteínas Gai que se encuentra a nivel citosólico, libre de $G\beta\gamma$, lo que sugiere la existencia de vías de señalización no canónicas para las subunidades Gai (Stow y col., 1991; Schurmann y col., 1992; Pimplikar y Simons 1993; Wilson y col., 1993; Muller y col., 1994; Montmayeur y Borrelli 1994; Ogier-Denis y col., 1995; Maier y col., 1995; Denker y col., 1996; Lin y col., 1998; Marrari y col., 2007). Esto se debería a que Gai es capaz de reorganizar su estructura proteica ocultando la modificación lipídica que la ancla a la membrana, lo que aumenta su solubilidad y permitiría la interacción con otros efectores a nivel del citosol (Preininger y col., 2003). Es en este nivel subcelular, que Gai podría estar cumpliendo funciones no canónicas, entre las cuales han sido estudiadas el control de la dinámica del huso mitótico durante la división celular asimétrica, el establecimiento de la polaridad celular, la proliferación, la diferenciación y migración

en procesos del sistema inmune y procesos patológicos como el cáncer (Feigin y Muthuswamy, 2009).

3.3 Gai2 y migración celular

La migración celular durante la morfogénesis del tejido requiere cambios en la polaridad celular por modificaciones en la organización del citoesqueleto, ante señales mecánicas y químicas del entorno circundante (Abercrombie y col., 1971; Schwarz y Gardel, 2012; Roubinet y col., 2012). Por ejemplo, durante una respuesta inmune, las señales químicas generadas por la interacción entre los quimioatrayentes con sus receptores dirigen la localización de los leucocitos hacia varios tejidos y órganos periféricos para mediar la inflamación. En este contexto, la mayoría de los quimioatrayentes y quimioquinas emiten señales a través de GPCR que se acoplan con la subunidad Gai (Hepler y Gilman, 1992; Neer, 1995) para activar efectores río abajo con el fin de controlar la migración de las células del sistema inmune (Arai y col., 1997; Neptune y col., 1997; Neptune y col., 1999).

En el sistema inmune las subunidades que mayormente se encuentran expresadas son la subunidad Gai2 y la subunidad Gai3 (Han y col., 2005), las cuales controlan muchas funciones biológicas de los leucocitos como la fagocitosis y la migración de los macrófagos (Weiss- Haljiti y col., 2004; Lee y col., 2009), la migración de células T y B hacia los ganglios linfáticos (Han y col., 2005; Hwang y col., 2007), la migración de eosinófilos a sitios de lesión tisular alérgica (Pero y col., 2007) y la migración de neutrófilos durante la inflamación aguda (Pero y col., 2007; Zarbock y col., 2007).

Varias herramientas moleculares junto con experimentos *in vivo* han permitido comprender las funciones de Gai durante la migración de las células del sistema inmune. En todos estos estudios, Gai2 ha sido descrita como la subunidad por excelencia que regula la migración de las células del sistema inmune mediante el control de la remodelación del citoesqueleto de actina y la quimiotaxis (Wiege y col., 2012). Asimismo, ratones Gai2^{-/-} muestran defectos en la señalización mediada por

el receptor de quimioquinas de las células B, lo que provoca una quimiotaxis reducida de estas células y una mala adherencia a las vénulas endoteliales altas (HEV) de los ganglios linfáticos, defectos que no son rescatados ni por Gai1, ni tampoco por Gai3 (Han y col., 2005). Por otro lado, la falta de función de Gai3 en las células T aumenta la migración tras la estimulación de CXCR3, lo que sugiere que esta isoforma de Gai puede ser un regulador negativo de la migración, y así demostrando que las distintas subunidades Gai podrían regular la migración celular a través de mecanismos completamente distintos (Thompson y col., 2007).

En este contexto, en nuestro laboratorio se determinó la expresión del ARNm de Gai2 por hibridación *in situ* en estadios de néurula temprana y néurula tardía en embriones de *Xenopus tropicalis*, encontrándose que Gai2 se localiza tanto en la zona de la CNC, como en derivados de la CNC, además de las placodas y tejido circundante (Fuentealba y col., 2016), lo que sugiere fuertemente un papel regulador de Gai2 en los procesos que llevan a la formación y diferenciación de la CNC, como por ejemplo en la migración celular. Además estudios preliminares, mostraron que la pérdida de función de Gai2, inhiben la migración de las células de la CNC de *Xenopus* (Villaseca, Tesis de Magister).

Todos estos antecedentes nos llevaron a escoger a Gai2 como la subunidad que podría regular la migración de la CNC en *Xenopus*, la cual constituyó nuestro objetivo de estudio durante esta tesis doctoral.

3.4 Gai y microtúbulos

Durante la división celular asimétrica en embriones de *Caenorhabditis elegans* y neuroblastos de *Drosophila*, se ha descrito una vía de señalización no canónica para la subunidad Gai, la cual regula la función de los MTs durante el posicionamiento del huso mitótico (di Pietro y col., 2016; Fig. 7). Específicamente, en *C. elegans*, la división celular asimétrica está controlada por un complejo proteico que se asocia con los MTs astrales generando un desequilibrio en las fuerzas

corticales posicionando asimétricamente el huso mitótico (Grill y col., 2001). Este complejo molecular está compuesto por la subunidad Gai de la proteína G heterotrimérica, leucina-glicina-asparagina (LGN), complejo dineína/dinactina y la proteína de aparato nuclear y mitótico (NuMA) (Figura 7). En numerosos estudios la subunidad Gai juega un papel crucial durante este proceso ya que su inactivación o pérdida de función da como resultado una fuerza de tracción fuertemente reducida, la cual se traduce en una pérdida de la división asimétrica (Colombo y col., 2003; Gotta y col., 2003; Srinivasan y col., 2003; Kiyomitsu, 2019; Poon y col., 2019). También se ha observado, en mamíferos, que tanto Gai como LGN y NuMA son cruciales para la interacción entre los MTs astrales y la corteza celular (Du y Macara, 2004; Woodard y col., 2010), proceso que estaría controlado por la proteína de resistencia a inhibidores de colinesterasa 8 (Ric-8), un GEF no canónico con actividad chaperonina, que estabiliza la unión de Gai-GDP con LGN (David y col., 2005). Otros autores también han descrito a GIV/Girdin como GEF que controla la polaridad celular junto con Gai3, a través de la proteína Par-3, para el establecimiento de la polaridad apicobasal (Sasaki y col., 2015). De forma interesante, se ha encontrado que Par-3 también controla la dinámica de los MTs durante la migración de la CNC de *Xenopus* (Moore y col., 2013).

La asociación de Gai con los MTs del huso mitótico sugiere que esta subunidad podría regular el ensamblaje y desensamblaje, controlando con ello la dinámica de los MTs. Esta idea, aunque aún no se comprende por completo, proporciona una base racional para comprender el mecanismo por el cual Gai contribuye a otros procesos biológicos a través del control de la dinámica de los MTs y el establecimiento de la polaridad celular, por ejemplo, durante la migración celular, lo que será discutido ampliamente en esta tesis.

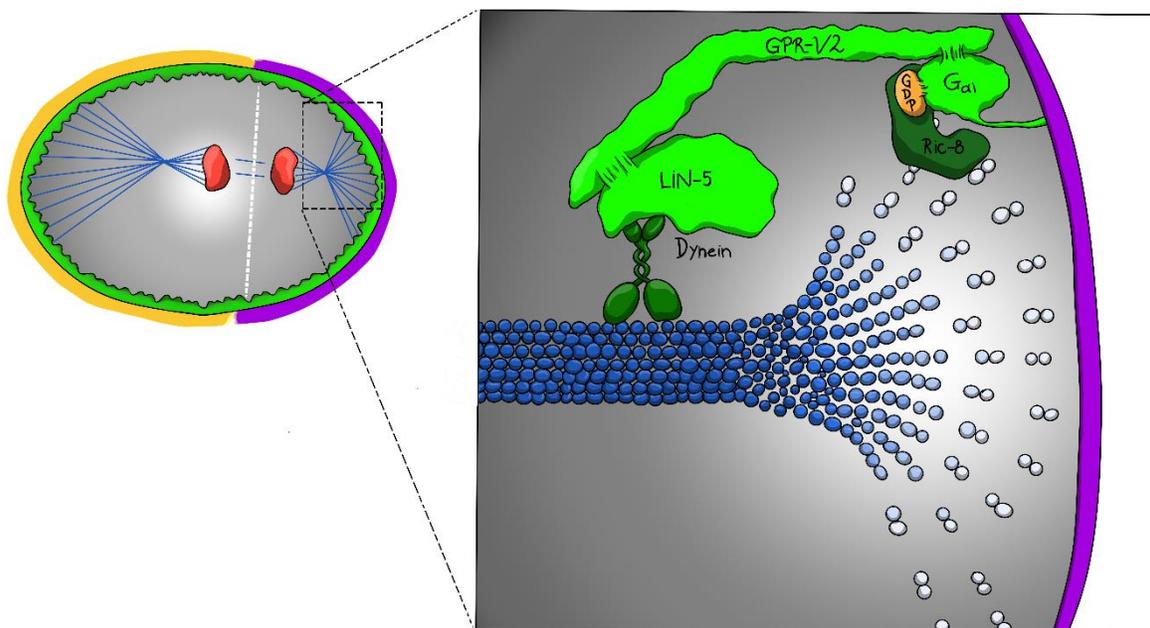


Figura 7. Vía de señalización no canónica de Gai regula la división asimétrica. Conservación evolutiva del complejo molecular compuesto por la subunidad Gai de la proteína G heterotrimérica, LGN, complejo dineína/dinactina y NuMA (respectivamente Gai, Pins y Mud en *Drosophila*, y GOA-1/GPA-16, GPR-1/2, y LIN5 en *C. elegans*), el cual se localiza en el dominio subcortical que recluta a dineína, una proteína motora, que también determina el movimiento a lo largo de los MTs astrales y genera las fuerzas de tracción necesarias para orientar correctamente el huso (Adaptado de Villaseca y col., 2022)

3.5 Microtúbulos y proteína G heterotrimérica

Algunos estudios en los últimos años han revelado que la proteína G heterotrimérica modula el ensamblaje de los MTs *in vitro* a través de sus subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ (Roychowdhury y col., 1997; Roychowdhury y col., 1999; Roychowdhury y col., 2006). Específicamente, se ha encontrado que las subunidades Gai, Gas y Gao inhiben el ensamblaje de los MTs aumentando su desensamblaje al activar la actividad GTPasa intrínseca de la tubulina (Roychowdhury y col., 1999). Por lo tanto, la subunidad $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica cumple una función como proteína activadora de GTPasa (GAP) para la tubulina, aumentando así la dinámica de los MTs al eliminar el “GTP cap” (Roychowdhury y col., 2008). Por otro lado, y a

diferencia de $G\alpha$, $G\beta\gamma$ promueve el ensamblaje de MTs *in vitro* (Roychowdhury y col., 1997).

Algunos trabajos han sugerido que la modificación lipídica de las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ no sólo estaría contribuyendo a su asociación con la membrana plasmática, sino también a las interacciones con moléculas efectoras y con receptores (Iniguez-Lluhi y col., 1992; Mumby y col., 1994). De hecho se observó que al reconstituir el heterotrímero INACTIVO $G\alpha\beta\gamma$ a partir de $G\alpha$ -miristoilado y $G\beta\gamma$ -prenilado se bloquea la activación de la actividad GTPasa de la tubulina por acción de $G\alpha_i$, por lo tanto para que $G\alpha_i$ pueda estimular la actividad GTPasa de la tubulina, $G\alpha_i$ debe encontrarse libre de $G\beta\gamma$ (Roychowdhury y col., 2006), como se muestra en la figura 8. Por otro lado, cuando se utilizó Nocodazol para estimular la despolimerización de los MTs se vio una alteración en la interacción entre la tubulina y la subunidad $G\beta\gamma$ en células PC12 y NIH3T3, inhibición que se restauró al lavar el Nocodazol y establecer el ensamblaje de los MTs. Esto sugiere que $G\beta\gamma$ podría controlar el ensamblaje de los MTs, esta vez *in vivo* (Montoya y col., 2007). Sin embargo, se observó que la interacción entre la subunidad $G\alpha_s$ y la tubulina no fue inhibida por el tratamiento con Nocodazol, lo que sugiere que la subunidad $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ podrían estar uniéndose a regiones diferentes de la tubulina *in vivo* (Montoya y col., 2007).

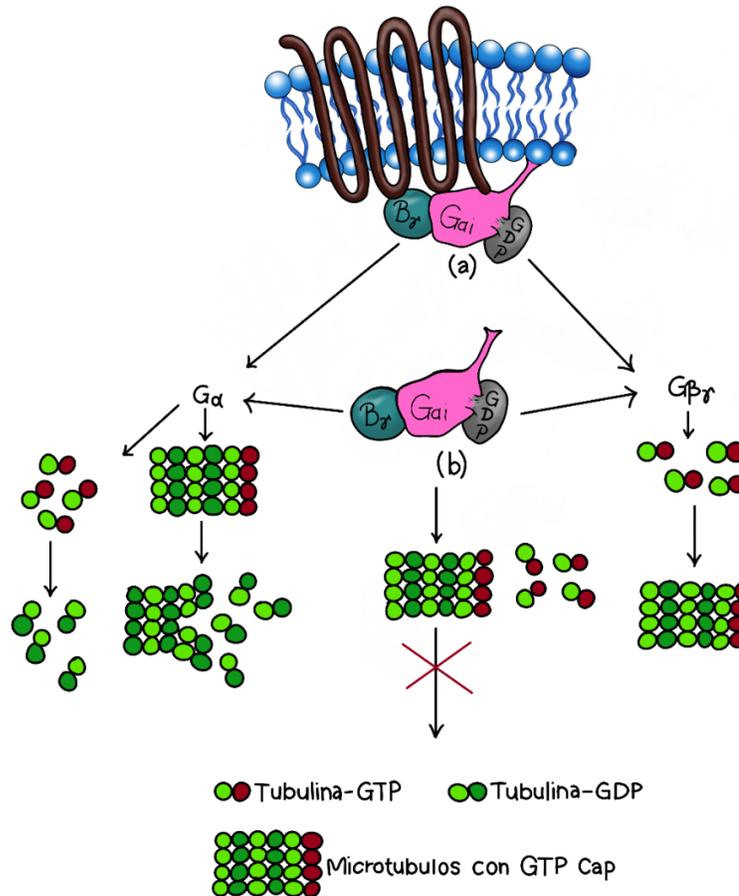


Figura 8. Modulación del ensamblaje de los MTs por la proteína G heterotrimérica. Este modelo muestra la activación vía receptor (a) o vía independiente de receptor (b) del heterotrímero $G\alpha/\beta\gamma$. Tras la activación del receptor, $G\alpha$ se libera del dímero $G\beta\gamma$. Tanto $G\alpha$ como $G\beta\gamma$ interactúan con los MTs para modular su dinámica de ensamblaje/desensamblaje. Sin embargo, al reconstituirse el heterotrímero inactivo, éste ya no puede interactuar con los MTs (Adaptado de Roychowdhury y col, 2006).

Debido a que la proteína G heterotrimérica regula una serie de eventos, incluida la dinámica de tubulina, y debido a que los MTs regulan el tráfico polarizado de proteínas hacia lugares específicos de la célula, se hace fundamental conocer la función de la proteína G heterotrimérica sobre los MTs en el contexto migratorio, donde la célula está en constante cambio de polaridad y morfología.

Planteamiento del problema y contexto del trabajo de tesis:

Existe una creciente evidencia de que la dinámica de los MTs y los niveles de Rac-GTP son críticos para la migración celular. Sin embargo, el control espacio temporal de los eventos de polimerización o despolimerización de los MTs durante la migración celular colectiva es poco conocido.

Como mencionamos antes, durante la división celular asimétrica, la familia G α i/o se localiza en la corteza celular controlando la polaridad celular y las fuerzas de los MTs para orientar correctamente el huso mitótico. Además, la subunidad G α i2 específicamente, ha sido estudiada controlando la migración de células del Sistema Inmune, a través de quimioquinas como Sdf-1, la cual también participa en la migración de la CNC. Asimismo, en nuestro laboratorio hemos descrito que la proteína G heterotrimérica, específicamente G α i2, regula la migración de las células de la CNC, ya que la pérdida de función de G α i2 se traduce en la inhibición de la migración de estas células y en la deslocalización de las proteínas Par3 y ζ PKC (S. Villaseca, *Tesis de Magíster*, 2017). Por otro lado, análisis previos también en nuestro laboratorio, evidenciaron una distribución anormal de los MTs en células de CNC bajo condiciones de pérdida de función de G α i2, además de que G α i2 se expresa en la CNC y derivados de la CNC en embriones de *Xenopus tropicalis*. Pese a toda la información que se tiene de la familia G α i, la localización y función de la subunidad G α i2 durante la migración celular no están bien caracterizadas, y con ello su posible contribución a regular la dinámica de los MTs durante este evento no está del todo clara. Es por esta razón que en esta tesis nos planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis

“G α i2 regula la polaridad celular a través del control de la dinámica de los MTs durante la migración colectiva en células de la Cresta Neural Craneal (CNC) de *Xenopus*”

Para responder a esta hipótesis, nos hemos planteado el siguiente Objetivo General y Objetivos específicos:

Objetivo General: Estudiar el mecanismo molecular a través del cual G α i2 regula la polaridad celular y la dinámica de los MTs durante la migración de la CNC de *Xenopus*.

Objetivos Específicos:

- 1. Estudiar el efecto de la pérdida de función de G α i2 durante la migración de las células de la CNC *in vivo* e *in vitro***
 - 1.1 Estudiar la migración *in vivo* en condiciones de pérdida de función de G α i2 a través del seguimiento de las rutas migratorias de la CNC en el embrión completo
 - 1.2 Estudiar la migración *in vitro* en condiciones de pérdida de función de G α i2 a través de la dispersión radial en explantes de CNC
 - 1.3 Estudiar la morfología celular analizando la distribución del citoesqueleto de actina y tubulina condiciones de pérdida de función de G α i2
- 2. Estudiar la función de G α i2 en la dinámica de los MTs durante la migración de la CNC en *Xenopus***
 - 2.1 Evaluar el efecto de la pérdida de función de G α i2 sobre la tubulina estable y la tubulina dinámica

- 2.2 Evaluar la dinámica de los MTs en el borde director y en el contacto célula-célula a través del seguimiento de proteínas de unión a MTs (EB3) en condiciones de pérdida de función de $G\alpha i2$
 - 2.3 Evaluar la interacción de $G\alpha i2$ con componentes de MTs (EB1, EB3, Tubulina)
 - 2.4 Estudiar el efecto epistático de drogas depolimerizantes de MTs en la migración celular de la CNC
 - 2.5 Analizar la función de $G\alpha i2$ sobre las adhesiones focales y su dinámica de desensamblaje dependiente de MTs, utilizando drogas depolimerizantes de MTs como nocodazol
- 3. Analizar la relación funcional de $G\alpha i2$ con componentes moleculares que regulan la polaridad celular durante la migración de la CNC en *Xenopus*.**
- 3.1 Evaluar el efecto de la pérdida de función de $G\alpha i2$ sobre proteínas de polaridad celular de la familia Rho y otras proteínas como Par3 y ζ PKC.
 - 3.2 Evaluar la interacción de $G\alpha i2$ con proteínas de polaridad celular
 - 3.3 Evaluar la relación de proteínas de polaridad celular con la dinámica de los MTs a través de ensayos de epistasis, en condiciones de pérdida de función de $G\alpha i2$ durante la migración de células de la CNC.

Materiales y Métodos

Materiales

Oligonucleótidos Morfolino

Oligonucleótido morfolino control (Mo Ctl):

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

Oligonucleótido morfolino contra Gai2 de *Xenopus* (Mo Gai2):

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:

- pCS105/eGFP-CAAX
- pCS2+XtGai2-V5
- pCS2+H2B-cherry
- pCS2+lifectin-GFP
- pCS2+EB3-GFP (para detección de cometas)
- pCS2+FAK-GFP
- pCS2+α5Integrina-GFP
- pCS2+ζPKC-GFP

- pCS2+pGBD-GFP (para detección de Rac-1 activo)
- pCS2+rGBD-GFP (para detección de RhoA 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 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-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-tubulina acetilada, Sigma-Aldrich (I: 1:50)
- Anticuerpo anti Par-3 sc-5598, Santa Cruz (I: 1:25)
- Anticuerpo anti ζ -PKC, Santa Cruz (I: 1:25)
- Anticuerpo anti β -Integrina, Hybridoma (I: 1:25)
- Anticuerpo anti fosfo-paxilina (pY118), Invitrogen. (I: 1:20)
- Anticuerpo anti fosfo-MLC (pS19), 3675S.Cell Signaling (I: 1:25)
- Anticuerpo anti GFP, C163, ThermoFisher (WB: 1:1000)
- 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 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/G-agarosa para inmunoprecipitación (Santa Cruz)

Proteína A/G-agarosa para inmunoprecipitación unida covalentemente a V5 (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)

ADNasa TURBO (Biolabs)

Métodos

1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas

1.1 Obtención de ovocitos de *Xenopus tropicalis* y fertilización *in vitro*

Tanto los métodos utilizados para la mantención y uso del modelo *Xenopus* como el protocolo de eutanasia fueron previamente estudiados y evaluados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Específicamente la metodología de eutanasia de anfibios utilizada se basó en el trabajo descrito por Close y col., 1996. La obtención de embriones de *Xenopus tropicalis* se realizó por medio de la técnica de fertilización *in vitro*, la cual será descrita a continuación.

La ovulación de las ranas hembras seleccionadas la noche anterior fue inducida previamente mediante la inyección sub-cutánea de hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG). Tanto hembras como machos fueron inyectados primero

con 20 unidades de HCG, aproximadamente 24 horas previo a la fertilización *in vitro*. Al día siguiente, y alrededor de cuatro horas previas a la fertilización, nuevamente todas las ranas fueron inyectadas pero ahora con 200 unidades de HCG, para permitir el desove. Para la extracción de los testículos desde los machos, el individuo fue anestesiado en solución de benzocaína y luego sacrificado por inmovilización y corte cervical, diseccionando los testículos a través de una incisión abdominal. Luego, estos últimos fueron macerados en medio L15 suplementado con 10% de FBS. Posteriormente, los ovocitos 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 para poder inyectarlos sin dificultad, proceso conocido como “desgelatinización”. Finalmente, los embriones fueron lavados e incubados en 1/9x MR a 26°C hasta el estadio requerido para la microinyección. Dos horas post-fertilización, el medio fue reemplazado por 1/20x MR con gentamicina a 100 g/mL, manteniendo los 26°C en una incubadora hasta alcanzar los estadios de néurula temprana y néurula tardía (Modificación de la metodología descrita por Sive y col., 2000).

1.2 Obtención de ovocitos de *Xenopus laevis* y fertilización *in vitro*

Los embriones de *Xenopus laevis* se obtuvieron como se describió anteriormente (Barriga y col., 2018) con algunas modificaciones.

Brevemente, la ovulación de hembras sexualmente maduras de *Xenopus laevis* fue inducida por la inyección subcutánea de 100 U de hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG) 2 a 3 días antes de la segunda inyección de 500-750 UI de hormona gonadotropina coriónica humana (Chorulon; Intervet), la cual se realizó aproximadamente 12-16 horas antes de la fertilización prevista. Las hembras ponedoras de huevos se mantuvieron en MMR 1X a 18°C desde la mañana del día

de la fertilización hasta la hora de la fertilización *in vitro*, lo que mantiene los ovocitos maduros naturalmente inactivados hasta la recolección.

Los testículos fueron obtenidos desde machos de *Xenopus laevis* anestesiados en solución Tricaína durante 40 min, y luego el sacrificio por degollamiento (modificado del protocolo de University College London) o por inmovilización y corte cervical (protocolo de la Universidad de Concepción). Los testículos fueron disecados y almacenados en MMR 1X con gentamicina (100 g/mL) a 4°C. Los ovocitos maduros se fertilizaron *in vitro* en una placa de cultivo de 100 mm (Falcon 734-0006) con 500 µL de MMR 0.1X que tenía un pequeño trozo de testículo aplastado. Después de 10 min, se añadió NAM 1/10 a la placa. Los huevos fertilizados fueron desgelatinizados en solución de cisteína, tal como se describe en 1.1. Los embriones se cultivaron a 18°C en NAM 1/10 y se obtuvieron los estadios correspondientes según la tabla de desarrollo embriológico normal de *Xenopus* (Nieuwkoop y Faber, 1967).

1.3 Microinyección de embriones

Las microinyecciones se llevaron a cabo en la sala de microinyección a temperatura adecuada (a 26°C para *Xenopus tropicalis* y a 18°C para *Xenopus laevis*), utilizando un microinyector Narishige IM300, observando a través de un estereoscopio de luz visible marca Olympus. Utilizando capilares de borosilicato como agujas finas para la microinyección, se microinyectó 2,1 nl de cada solución en embriones de *Xenopus tropicalis* y 10 nl de cada solución en embriones de *Xenopus laevis*, los cuales fueron dispuestos sobre placas de microinyección con 1/9x MR y 2% Ficoll para *X. tropicalis* y 3/8 NAM y 2% Ficoll para *X. laevis*. Posteriormente, el medio fue reemplazado por 1/20x MR en *X. tropicalis* y 1/10 NAM en *X. laevis* con gentamicina a 100 g/mL hasta alcanzar los estadios requeridos.

Para el desarrollo de esta tesis se diseñó un único oligonucleótido morfolino contra la región 5' UTR del ARN mensajero de Gai2 de *Xenopus*, el cual fue sintetizado

por GeneTools®. Los niveles de silenciamiento de Gai2 fueron previamente determinados mediante “Western Blot” (Figura 9G). Por otro lado, con el fin de determinar la toxicidad de este morfolino, se inyectaron también concentraciones equimolares de un morfolino control (Mo Control) no relacionado. Para ello, cada uno de los morfolinicos fue inyectado en conjunto con el marcador de linaje Rodamina-Dextrano o Fluoresceína al 1%, permitiendo de esta forma diferenciar el lado inyectado del embrión del lado no inyectado mediante fluorescencia.

Para los ensayos de pérdida de función de Gai2, las concentraciones de Mo Gai2 utilizadas fueron de 15 ng, 20 ng y 25 ng en *Xenopus tropicalis* y 25 ng, 30 ng y 35 ng en *Xenopus laevis*, microinyectando un blastómero dorsal y uno ventral del embrión en estadio de ocho células, de manera de silenciar sólo un lado del embrión y mantener el otro lado como control interno. Para todos los ensayos siguientes, tanto de rescate de fenotipo y de explantes de CNC, se utilizó una única concentración de Mo Gai2 (20 ng en *Xenopus tropicalis* y 35 ng en *Xenopus laevis*), la cual se logró estandarizar para un fenotipo de silenciamiento severo. Durante estos ensayos de rescate, el protocolo para la microinyección de embriones fue el mismo descrito previamente. Momentos previos a la microinyección, los morfolinicos fueron incubados a 65°C por al menos 3 horas, luego fueron vortexeados y centrifugados (centrífuga Force mini), y finalmente cuantificados mediante absorbancia a 260 nm realizando las respectivas diluciones a inyectar. Este procedimiento se llevó a cabo mediante la Metodología descrita por “Harland *Xenopus tropicalis* Site” debido a la baja solubilidad de estas moléculas y la facilidad con la que precipitan.

1.4 Fijación de embriones

Una vez que los embriones alcanzaron el estadio requerido (estadio 16 para inducción y 23-25 para migración) se fijaron en una solución de MEMFA para Hibridación *in situ* en embrión completo. La solución de fijación utilizada se preparó fresca y contenía: Formaldehído (FA) 3,7% p/v, 100 mM MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM

MgSO₄, a pH 7.4. Se realizó la fijación por 4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en un rotador lento, y posteriormente fueron lavados y almacenados en etanol 100% a -20°C hasta la Hibridación *in situ* (Modificación de la metodología descrita por Sive y col., 2000).

1.5 Hibridación *in situ* en embrión completo

El protocolo de Hibridación *in situ* es una modificación del descrito en el sitio web Harland Lab de *Xenopus* y probado previamente en el laboratorio (Fuentealba y col., 2013; Villaseca S. Tesis de Magíster, 2017). Este protocolo 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, de manera de hidrolizar la capa proteica del embrión y permitir que la sonda penetre tejidos internos. Luego 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 suave para no destruir los embriones.

Los embriones se fijaron por segunda vez en 3,7% formaldehído/PTw por 20 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se realizaron alrededor de 20 lavados con PTw de manera de quitar los restos de formaldehído. 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 requerida (*Snail2/Twist*) a una concentración final de 1µg/ml, incubando 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) y luego se bloqueó los embriones con "Blocking Reagent" (Roche) al 2% en MAB 1X 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 en agitación suave a 4°C. Ya en el tercer día de protocolo se realizaron múltiples lavados con MAB 1X con el fin de quitar los restos de anticuerpo que no se unió a la digoxigenina, 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") hasta ver la marca específica de las corrientes migratorias. Una vez que se logró identificar las corrientes, se detuvo la reacción cromogénica con MAB 1X y luego se fijaron los embriones por tercera vez, pero ahora con solución de Bouin (70% ácido pícrico saturado, 5% ácido acético glacial, 25% formaldehído) toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. El último día 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 SCC. 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, de manera de exponer las corrientes migratorias marcadas. Se mantuvieron los embriones en PBS 1X para realizar la fotodocumentación, y se almacenaron en etanol 100%. La fotodocumentación se realizó en un estereoscopio Olympus ZMV10 utilizando una cámara Leica DFC450.

1.6 Explantes de Crestas Neurales Craneales

Para realizar explantes de las células de la CNC, en primer lugar fue necesario remover la membrana vitelínica y la capa epidermal de los embriones en estadio 16-17 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 la CNC fueron cuidadosamente disectadas usando un “cuchillo” artesanal confeccionado con un pelo de ceja y una pipeta pasteur de vidrio, unidos a través de cera de vela. Cada explante fue colectado en una placa pequeña con medio DFA 1X (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 y filtrado) por un tiempo máximo de 30 minutos previo a ser pasados a un cubreobjeto de vidrio con fibronectina (50 µg/mL), también en medio DFA 1X. El tiempo de adhesión de los explantes al sustrato fue de aproximadamente 30 minutos, salvo las células morfantes que se adhirieron en menos de 10 minutos. Para el caso de los ensayos de dispersión se utilizó una placa de plástico la cual, luego de los 30 minutos fue llenada totalmente con medio DFA 1X y tapada para ser posteriormente invertida pegando la tapa con cera. 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” de célula viva a través de microscopía confocal. Estas técnicas se detallan en la sección siguiente.

1.7 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 20 minutos a temperatura ambiente y lavadas 3 veces en PBS 1X. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas por medio de dos lavados por 15 minutos totales en hielo, con una solución de tritón al 0.2% en PBS 1X, previamente enfriada. Las células se lavaron nuevamente tres veces con PBS 1X y se bloquearon 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.

Al segundo día, el anticuerpo primario fue removido mediante 10 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X para luego incubar con el anticuerpo secundario, Hoescht (tinción nuclear) y Faloidina (tinción citoesqueleto de actina) por máximo 2 horas a temperatura ambiente, en cámara húmeda. El anticuerpo secundario fue

lavado con PBS 1X y las muestras fueron montadas sobre un portaobjetos con 7 μ ls de solución de Dako.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

- Anticuerpo anti Gai2 monoclonal 1:50 (Santa Cruz) para el estudio de la localización de la proteína endógena en células de CNC de *Xenopus*,
- Anticuerpo anti α -tubulina monoclonal a una concentración de 1:100 (Sigma-Aldrich T9026) y F-actina 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 área de adhesiones focales en las distintas condiciones celulares.
- Anticuerpo anti- ζ PKC y anticuerpo anti-Par3 monoclonal usados a una concentración de 1:25 (Santa Cruz) como marcadores de polaridad celular.
- Anticuerpo anti-tubulina acetilada usado a una concentración de 1:50 (Sigma) para el estudio de los MTs estables
- Anticuerpo anti fosfo-MLC usado a una concentración de 1:25 (Cell Signaling) para el estudio de la localización de la vía ROCK activa
- Anticuerpo secundario anti rabbit/mouse 546 y 488 a una concentración de 1:200 (Life Technologies) para la conjugación de los diferentes anticuerpos primarios

1.8 Ensayos de “time-lapse”

Posterior a que los explantes fueron adheridos a la placa de vidrio con fibronectina (como se explicó en la sección 1.6) se obtuvo imágenes de cada explante en lapsos de 5 minutos por 10 horas para el estudio de dispersión celular en *X. laevis* y cada 3 minutos por 4 h en *X. tropicalis*, también en lapsos de 2 segundos por 5 minutos para la dinámica de MTs en *X. laevis* (1.5 segundos por 5 minutos en *X. tropicalis*) y lapsos de 20 segundos por 20 minutos para el estudio de polaridad celular en *X.*

laevis y *X. tropicalis*. 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 la dinámica de los microtúbulos y la polaridad celular (localización espacio temporal de Rac1 y RhoA) se utilizaron los equipos de microscopía confocal espectral LSM780 NLO Zeiss (objetivo 60X) y Leica SP8 (CMA Bio-Bio y University College London). 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 CNC, se determinó el cociente entre el área final ocupada por un explante (luego de 10 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 siguiendo cada núcleo teñido con H2B cherry (Image J 1.49q NIH, USA) al tiempo 0 (tiempo inicial) y a las 10 horas (tiempo final). Se evaluó la significancia con el test de ANOVA mediante comparaciones múltiples y los gráficos fueron procesados en Graphpad 8.

1.9 Estudio de la polaridad celular

Para ello se utilizaron dos criterios:

a) Localización espacio-temporal de las proteínas Rac1 y RhoA activas

Para evaluar el cambio de polaridad se estudió la localización de las proteínas G pequeñas Rac1 y RhoA en explantes de células de CNC en la condición control y condición morfante para *Gai2*. Para ello se microinyectó 150 pg de ARN mensajero (ARNm) de las sondas pGBD-GFP (detección de Rac1 activa) y rGBD-GFP (detección de RhoA activa) en embriones controles y embriones morfantes para *Gai2* (en estadio de ocho células, tal como se describió en la sección 1.3).

Doce horas post-fertilización las células se explantaron y se dispusieron sobre una matriz de fibronectina para la visualización *in vitro* del comportamiento de la GTPasa. Se obtuvieron imágenes de cada explante con el equipo de microscopía confocal espectral LSM780 NLO Zeiss (objetivo 60X) y Leica SP8, con intervalos de 20 segundos por 20 minutos, tiempo suficiente para favorecer la dispersión de las células controles. Los resultados fueron analizados con el plugin de pseudo-color de Image J 1.49q (NIH, USA), utilizando la misma intensidad de láser y ganancia digital para todas las condiciones.

b) Localización de la proteína Par3 y ζ PKC

Se ha descrito que, en células polarizadas como por ejemplo las células epiteliales, Par3 se encuentra asociado a complejos de adhesión célula-célula y ζ PKC se encuentra asociada a la zona apical, controlando el establecimiento de la polaridad apico-basal (Suzuki y col., 2001; Yamanaka y col., 2001; Gao y col., 2002; Nagai-Tamai y col., 2002; Chen y Macara, 2005). 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 de los MTs (Moore y col., 2013). Es por esta razón que en esta tesis se utilizó la localización de Par3 y ζ PKC como marcadores de polaridad celular durante la migración colectiva. Para ello, doce horas post-fertilización, las células de la CNC se explantaron y se sembraron en cubreobjetos con fibronectina para el análisis de la localización de Par3 y ζ PKC en ensayos de pérdida de función de Gai2. Las imágenes se obtuvieron con el equipo de microscopía confocal espectral LSM780 NLO Zeiss (objetivo 60X) y analizadas con el software Image J 1.49q (NIH, USA). Se comparó la intensidad de fluorescencia de todas las imágenes utilizando la misma intensidad de láser y misma ganancia digital.

1.10 Estudio de la dinámica de los MTs (Ensayo de cometas)

Para realizar estos ensayos se microinyectó 100 pg de ARNm de EB3GFP con el fin de marcar el extremo + de los MTs y analizar así su polimerización y depolimerización en la condición control y en la condición de morfolino para Gai2. Los explantes de CNC marcados con EB3GFP fueron capturados mediante “time lapse” en películas de 2 y 1.5 segundos cada frame, por 5 minutos totales. Las imágenes se seleccionaron recortando la región de interés, ya sea en el borde director de las células o en el contacto célula-célula. Las imágenes fueron procesadas utilizando StachReg de ImageJ. Luego se analizaron las películas de forma manual a través de la herramienta MTrack y luego de forma automática a través del software PlusTipTracker. Para analizar la catástrofe de los MTs se seleccionaron cuadrados de 5 μm x 5 μm en el contacto célula-célula y en el borde director. Se contabilizó el número total de cometas de EB3GFP que ingresaron al rectángulo, además de aquellos que todavía estaban en el rectángulo cuando concluyó el análisis, y se compararon con el total de cometas de EB3GFP que desaparecieron dentro del cuadrado en el período de 5 minutos.

El análisis automático se realizó utilizando PlusTipTracker de Matlab. El algoritmo de seguimiento general utilizado en el paquete del software ya ha sido validado anteriormente (Jaqaman y col., 2008). Posteriormente, Matov y col. aplicaron un concepto de enlace de “subtrack” (2010), gracias al cual es posible inferir eventos de pausa y contracción de MTs basados en los “tracks” de crecimiento de las +TIP. Luego, este método se actualizó a PlusTipTracker, que emplea un método más robusto que es auto adaptativo y libre de parámetros de control (Applegate y col., 2011).

Para analizar la dinámica de los MTs automáticamente usando plusTipTracker, los parámetros de seguimiento óptimos para los cometas se determinaron utilizando plusTipGetTracks. Esto permite obtener una gama de valores a probar para cada parámetro, manteniendo todos los demás constantes. A partir de esto, se determinó

que los siguientes parámetros eran los más precisos y se usaron para todos los análisis: **Search Radius Range (pixels) 5-12, Minimum Sub-Track Length (frames) 3; Max Gap Length (frames) 8; Max Shrinkage Factor 0,8; Max angle Forward 40; Max angle Backward 10; Fluctuation Radius 2,2.**

2. Técnicas de Biología Molecular

2.1 Síntesis de sonda y ARN mensajero *in vitro*

Tanto las sondas como los mensajeros de ARN se sintetizaron *in vitro* 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 ARN 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 por densitometría, comparando con marcador de peso molecular (λ *HindIII*) empleando Image J 1.49q (NIH, USA) y luego se utilizó 1.5 μ g 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 marcado con digoxigenina) junto al resto de la mezcla de nucleótidos y la ARN polimerasa correspondiente, según las especificaciones de la enzima en cuestión (Sp6 o T7, Promega). Por otro lado, para la generación de ARN mensajero se empleó el kit de transcripción *in vitro mMESSAGING mMACHINE SP6*, según recomendaciones de la empresa (Life Technologies). Ambas reacciones se realizaron en agua libre de nucleasas. Con el uso de ADNasa Turbo se removió el ADN inicial y posteriormente se purificó los ARN mensajeros a través de

precipitación con LiCl agregando 30 μ l a la reacción final, para luego centrifugarla por 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C.

2.2 Lisis de embriones

Se colectaron los embriones para ensayos de inmunoprecipitación y/o “western blot”, los cuales fueron almacenados a -80°C sin buffer hasta su lisis o bien lisados inmediatamente. Para la lisis se agregó 20 μ l 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 hasta obtener una solución gris homogénea y se dejó reposar 5 minutos en hielo. Luego se centrifugó los lisados a 400g por 10 minutos a 4°C, de manera de separar las proteínas de los restos celulares. 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 en un espectrofotómetro de la marca Implen.

2.3 Detección de proteínas mediante Western Blot

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, cargando 15 μ g de lisado total y geles de 1.5mm para las inmunoprecipitaciones, utilizando 1 mg o 0.5 mg de lisado en cada inmunoprecipitación.

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 para favorecer su denaturación, de manera de separarlas sólo en base a su relación masa/carga. Luego las muestras se sembraron junto al estándar pre-teñido (Fermentas) en el gel, para posteriormente separarlas a un voltaje constante de 100V en solución de corrida 1X (25mM Tris, 250mM glicina,

0.1% SDS). Posteriormente las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa en solución de transferencia previamente enfriada a -20°C (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanol) durante 1 hora (para geles delgados) y 2 horas (para geles gruesos). El procedimiento de transferencia se realizó a 4°C y a un amperaje constante de 0.250A (250mA). Para verificar que la transferencia ocurrió satisfactoriamente, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo Ponceau para revelar las proteínas. Luego se realizaron múltiples lavados de la membrana con agua destilada (de manera de quitar todo el rojo Ponceau), para luego bloquearla con leche descremada al 5% marca Svelty en TBS-Tween (150mM NaCl, 10mM Tris, 0.05% Tween20) durante mínimo 1 hora. Después se incubó con el anticuerpo primario por toda la noche en TBS-Tween. Al día siguiente se lavó tres veces con TBS-Tween por 10 minutos cada lavado y se incubó finalmente el secundario por 1 hora a temperatura ambiente, realizando posteriormente los tres lavados con TBS-Tween correspondientes.

Finalmente, las proteínas en la membrana se revelaron con líquidos quimioluminiscentes ("Western Lightning Plus-ECL", Perkin Elmer) y se expuso a un film autoradiográfico (Ultracruz Autoradiography Film Blue, Santa Cruz Biotechnology) en una sala oscura. Luego, con el fin de detectar otra proteína en el mismo gel, se realizó "stripping" sobre la membrana con solución de stripping de bajo pH ("Low pH Stripping Solution", 25mM Glicina-HCl, 1% p/v SDS) por 45 minutos con el fin de hidrolizar las interacciones entre los antígenos y 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).

2.4 Co-inmunoprecipitación

Para cada inmunoprecipitación se empleó 1 o 0.5 mg de proteína total por ensayo (dependiendo de la eficiencia de obtención de proteína total), donde se consideran como muestras: la inmunoprecipitación de la proteína en cuestión, el control con

anticuerpo no relacionado, y un último control con proteína A/G (Thermo Scientific) agarosa sola. El día anterior a la coimmunoprecipitación se equilibró los tubos con 25µl de 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. El segundo día de inmunoprecipitación se incubó la proteína A/G agarosa con los anticuerpos respectivos por 2 horas a 4°C en agitación. Es importante recalcar que para identificar la interacción con proteínas de bajo peso molecular como Eb1 se utilizó un anticuerpo anti V5 unido covalentemente a la resina de A/G agarosa (Santa Cruz Biotechnology) para poder eluir la inmunoprecipitación, y de esta manera la cadena liviana del anticuerpo no enmascare a la proteína a detectar. En paralelo a la incubación con anticuerpos, se realizó el “pre-aclarado” del lisado, utilizando proteína A/G agarosa previamente equilibrada, incubando el lisado de proteínas por 2 horas en agitación a 4°C. Se realizaron centrifugaciones por 2 minutos a 2000g a 4°C, se descartó el sobrenadante de todos los tubos, menos del “pre aclarado”, para luego distribuir el sobrenadante de este último entre todos los tubos restantes. Se realizó la inmunoprecipitación incubando toda la noche a 4°C en presencia de inhibidores de proteasas. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante de las incubaciones y las resinas se lavaron 5 veces con buffer de lavado (buffer de lisis sin inhibidores de proteasas). Para la elusión se incubó la resina con 50 µL de SDS 1% por 1 hora a 37 °C, tiempo tras el cual se separó la resina del eluato y se analizaron ambas fracciones por SDS-PAGE y Western Blot.

Resultados

I. **Gai2 es requerida para la migración de las células de la cresta neural craneal (CNC) en *Xenopus***

Para investigar el papel de Gai2 en la migración de las células de CNC en *Xenopus*, se realizaron ensayos de pérdida de función donde se microinyectó un morfolino específico contra la región 5' UTR de Gai2 en embriones en estadio de 8 células con el fin de dirigir la pérdida de función principalmente a la CNC, sin afectar el mesodermo. Como control de inducción se evaluó la formación de la CN en estadio 16 (Fig. 9A) y la migración de la CN en estadio 25-26 (Fig. 9C, 9D). También se microinyectó un morfolino control para evaluar la toxicidad de las cantidades equimolares (Fig. 9B) y Rodamina dextrano como trazador de linaje en todas las condiciones. Para evaluar la migración de las células de CNC *in vivo* en embriones completos se realizó hibridación *in situ* empleando una sonda contra el ARN mensajero de *Twist* como marcador específico de CNC (Fig. 9B-D), fenotipo que fue cuantificado en base la longitud total de la migración de las tres corrientes: mandibular, hioide y branquial, tal como se muestra en la figura 9E (*X. tropicalis* n total = 30; *X. laevis* n total = 18). Se observó que con 35 ng de Morfolino contra Gai2 no hubo efecto sobre la inducción de la CN (Fig.9A), pero si se obtuvo una pérdida severa de la migración (60-70% de inhibición de la migración; Fig. 9F), fenotipo que fue rescatado al microinyectar 150 pg de ARNm de Gai2, el cual no es afectado por el morfolino. Asimismo, se verificaron los niveles de proteína mediante western blot (Fig. 9G-H).

Para evaluar la migración 2D *in vitro*, se utilizó 35 ng de morfolino contra Gai2 y se extrajeron las CNC desde embriones en estadio 17, las cuales fueron cultivadas sobre placas recubiertas con fibronectina. Los explantes de CNC se observaron mediante "time lapse" de bajo aumento en un microscopio Nikon Eclipse 80i con una cámara Hamamatsu controlada por el Programa PCI, equipada con platina motorizada y una lente seca 10X/0.30NA, UCL, Reino Unido. Al cuantificar la

dispersión celular a través de triangulación de Delaunay (Carmona-Fontaine y col., 2011) se observó una severa disminución de la dispersión de las células morfantes al compararlas con el morfolino control tras un seguimiento de 10 h (Fig. 9I-L). Esto significa que la relación entre el área final versus el área inicial de los triángulos es significativamente menor en células morfantes versus células control, lo que indica que las células no pudieron migrar radialmente en condiciones de pérdida de función de Gai2. En resumen, los resultados de este objetivo sostienen que Gai2 estaría regulando la migración de las células de la CNC en *Xenopus*.

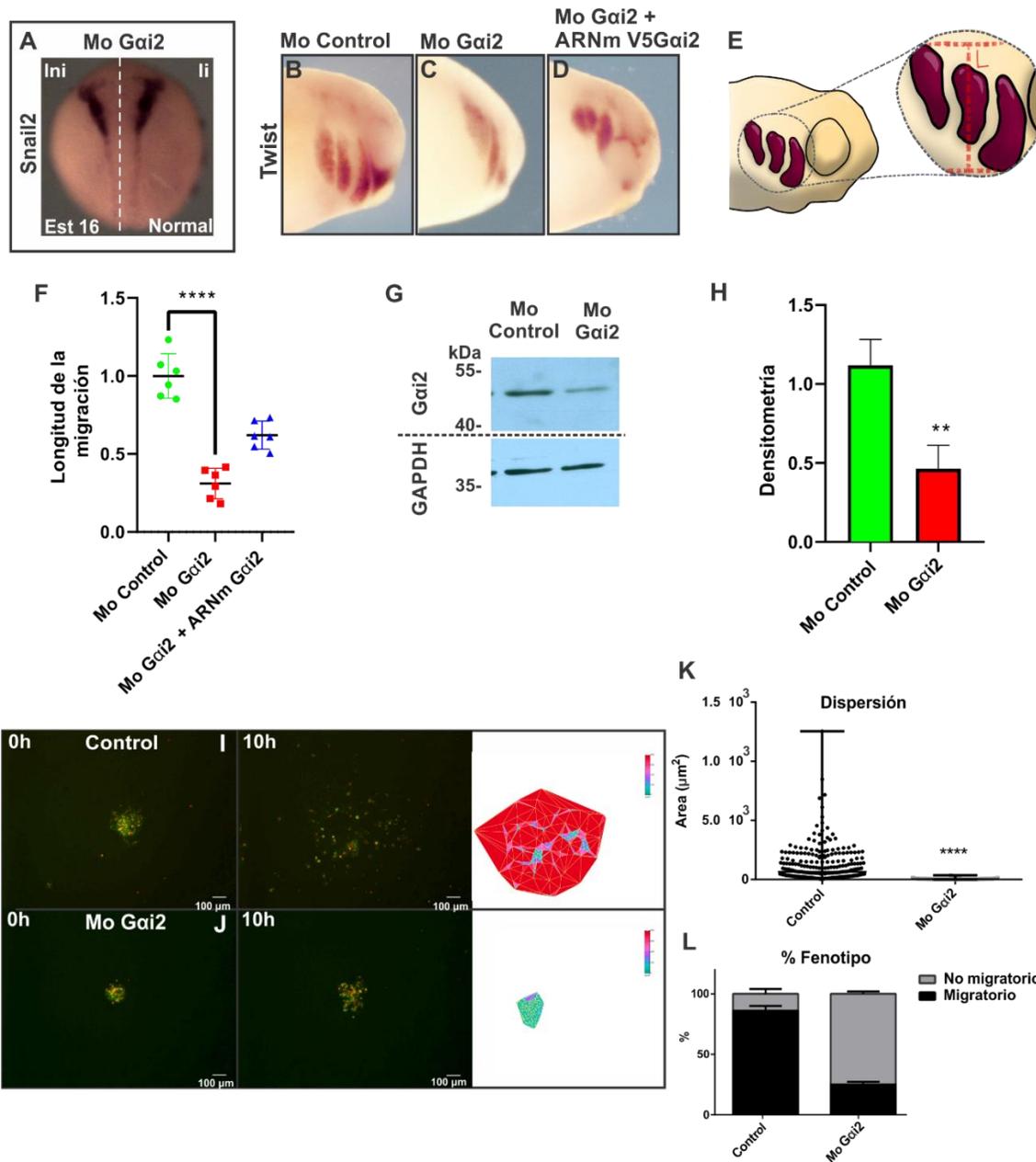


Figura 9. La pérdida de función de Gai2 inhibe la migración de las células de CNC *in vivo* e *in vitro*. La hibridación *in situ* se realizó en embriones de *Xenopus* en estadio 16 para analizar inducción y en estadios 25 y 26 usando *snail2* y *twist* como marcador de CN, respectivamente. A los embriones se les inyectó morfolino contra Gai2 (Mo Gai2, C), para disminuir la expresión de Gai2 (G, H). A los embriones morfantes de Gai2 se les inyectó ARNm de V5Gai2 (D y F) para rescatar el fenotipo morfante. El morfolino de Gai2 afectó la migración *in vivo* de la CNC (C, F), pero no así la inducción (A). Ini: lado no inyectado, li: lado inyectado. (E) Esquema del embrión de *Xenopus* que muestran las corrientes de CNC en púrpura, lo cual ilustra que la longitud de la migración se midió en el punto medio del ancho total de las tres corrientes de CNC. (F) Cuantificación de la longitud de la migración de la CNC de B, C y D. n = 3 embriones de cada condición. Cada punto es el valor medio de un total de 6 experimentos independientes. Las barras de error son ± s.e.m. **P≤0.01, ****P≤0.0001 (prueba *t-Student* de dos colas). Escala: 100 μm. (I-J) Se realizaron explantes

de células de CNC desde embriones control y embriones inyectados con morfolino de *Gai2*, los cuales fueron cultivados en fibronectina, y se evaluó la migración en las diferentes condiciones durante 10 horas mediante *time-lapse*. (K) Se realizó triangulación de Delaunay para cuantificar la dispersión celular. El área promedio se graficó a las 0 y 10 horas. Barra de error: error estándar, **** $P \leq 0.0001$, $n = 13$ (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). **Aumento de 10X.** Barra: $100\mu\text{m}$ (L) Porcentaje de fenotipo migratorio/no migratorio del total de explantes de CNC.

II. Gai2 es requerida para mantener la dinámica de actina, la distribución de tubulina y la morfología de las células de la cresta neural craneal en *Xenopus*

Para comenzar a dilucidar el mecanismo molecular por el cual Gai2 controla la migración de células de la CNC, se analizó el efecto de la pérdida de función de Gai2 sobre la morfología celular y la dinámica del citoesqueleto de actina. En primer lugar, se explantaron células de CNC en estadio 17 a partir de embriones microinyectados con H2BCherry y Lifeactin GFP, los cuales se cultivaron en fibronectina y se examinaron mediante microscopía confocal espectral (Leica SP8, CMA-BioBio) y “time lapse”. Con el fin de cuantificar el cambio en la morfología celular durante la migración en la condición control y en la condición morfante, se analizó a través del software ADAPT el área protruyente, el área retráctil, la velocidad de crecimiento de la protrusión y la velocidad de la retracción (Fig. 10).

Como resultado se obtuvo que las células inyectadas con morfolino contra Gai2 mostraron un aumento significativo en el área protruyente en comparación con los controles (alrededor de un 70%, mientras que las células control protruyen sólo en un 30%) (Fig. 10A-C). El área retráctil disminuyó significativamente en la condición morfante (las células control se retraen en aproximadamente un 60%, en cambio las células morfantes sólo experimentan alrededor de un 30% de retracción) (Fig. 10D). También se analizó la velocidad del crecimiento de la protrusión versus la velocidad de las retracciones, encontrándose que tanto las células control como las células morfantes no muestran diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de la protrusión, a pesar de que las células morfantes muestran una clara tendencia a ser más lentas en su dinámica de actina ($2.06 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.51$ para las células control; $0.89 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.88$ para las células morfantes), no obstante la velocidad de retracción fue significativamente menor en las células morfantes en comparación a las células control ($2.04 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.72$ para las células controles; $0.26 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.13$ para las células morfantes), lo que evidencia que las células morfantes para Gai2 experimentan problemas con la contracción del cuerpo celular, lo que sugiere

que Gai2 está regulando los procesos dinámicos necesarios para la migración celular.

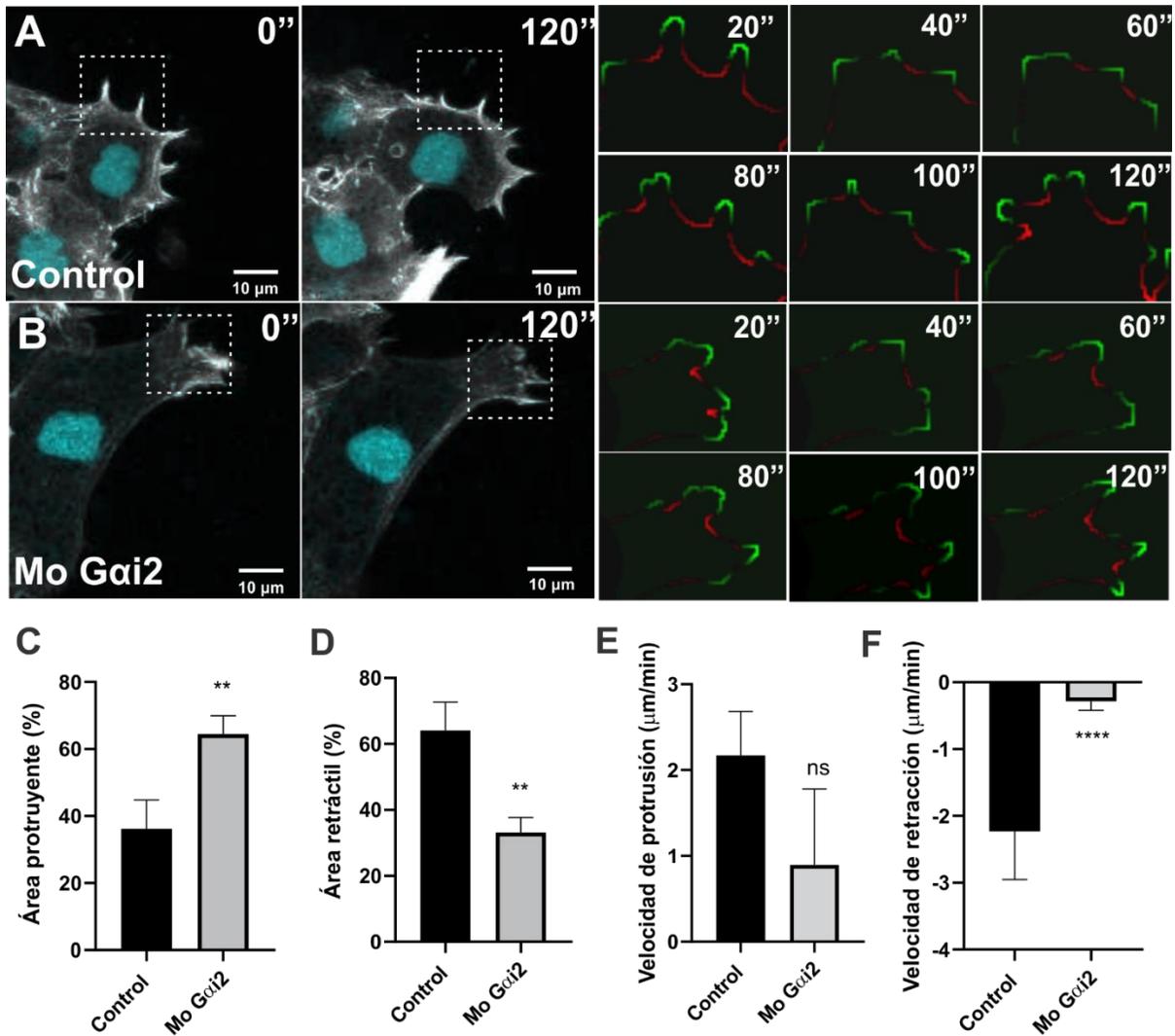


Figura 10. La pérdida de función de Gai2 altera la dinámica del citoesqueleto de actina de las células de CNC. Embriones de *Xenopus* se microinyectaron con Lifeactin GFP y H2B Cherry para evaluar la distribución del citoesqueleto de actina en el tiempo de explantes de CNC. Se evaluó la dinámica del citoesqueleto de actina durante 5 minutos, cada 20 segundos, mediante microscopía confocal (Leica SP8, CMA) y *time-lapse*. Los videos fueron procesados a través del software ADAPT de ImageJ. **(A-B)** Las películas se segmentaron y se obtuvo el área protruyente en verde y el área retráctil en rojo (cuadrado punteado blanco en los paneles A y B, la cual se amplió en los paneles a la derecha, imágenes que fueron obtenidas gracias a la segmentación). **(C-F)** Se cuantificó el porcentaje de área protruyente, el porcentaje de área retráctil, la velocidad de crecimiento de protrusión y velocidad de retracción a través del software ADAPT. Las barras de error corresponden a \pm SEM. ** $P \leq 0.0086$; **** $P \leq 0.0001$. $n = 3$ experimentos por condición (T-test independiente) Se analizaron 3 células elegidas al azar por cada experimento. **Aumento: 63X.** Barra: 10 μ m.

También se analizó la distribución del citoesqueleto de actina y tubulina mediante ensayos de inmunofluorescencia (Fig. 11). Tanto la distribución de actina cortical como la organización de los MTs se observó mediante inmunofluorescencia contra α -tubulina y F-actina, y se cuantificó de la forma como se muestra en la Fig 11J, determinándose que para las células controles la actina cortical se encuentra concentrada en el borde director (Fig. 11A, escala pseudocolor flecha verde), mientras que los MTs se distribuyen desde el centrosoma hacia el borde de la célula de manera radial (Fig. 11C, escala pseudocolor). Muy por el contrario, para el caso de las células morfantas, la actina cortical se pierde en el borde director de la célula (Fig. 11D, corchete blanco), mientras que la tubulina se concentra hacia el borde director de manera significativa (Fig. 11E, Fig. 11F flecha verde escala pseudocolor). Al observar los gráficos de intensidad de fluorescencia se evidencia que las células morfantas para Gai2 (Fig. 11E) poseen una distribución completamente contraria a las células controles (Fig. 11B) de actina cortical versus tubulina, con una aparente inversión de la organización de ambos citoesqueletos. Esto es interesante ya que se sugiere que la tubulina altamente concentrada en las células morfantas para Gai2 podría estar ocupando el espacio que requiere la actina para conformar el córtex celular. En todos los casos en que se analizó la morfología de las células morfantas para Gai2 se observó un aumento del área protruyente (Fig. 10C, Fig. 12B-D) con una disminución en la circularidad de las células (Fig. 12E), lo que podría estar relacionado con la organización de los MTs en dirección al frente celular. Si los MTs se encuentran altamente polimerizados hacia el borde director, y ocupando el espacio de la actina cortical cortical, una alternativa para intentar restaurar la distribución de la tubulina, y con ello de la actina, podría ser utilizar una droga despolimerizante de los MTs. En este sentido, al utilizar 10 μ M de Nocodazol se observó, como se esperaba, una despolimerización eficiente de los MT (Fig. 11I, escala pseudocolor) y un rescate parcial en la distribución de la actina cortical (Fig. 11G, escala pseudocolor), lo que se aprecia también en los gráficos de intensidad de fluorescencia (Fig. 11H), demostrando que en las células morfantas para Gai2 efectivamente los MTs estarían ocupando el espacio de la actina cortical, afectando la morfología celular (otorgándole esta morfología alargada) y con ello,

afectando también la migración apropiada de la CN. Por lo tanto, el tratamiento con Nocodazol también permitió rescatar la morfología celular (Fig. 12A-C) disminuyendo significativamente el área protruyente (Fig. 12D) y aumentando significativamente la circularidad de la célula, la cual se había perdido en condiciones de pérdida de función de Gai2 (Fig. 12E).

Por lo tanto, todos estos antecedentes apuntan a que **la organización de los MTs sería el factor clave para la migración de la CN regulada por la subunidad Gai2.**

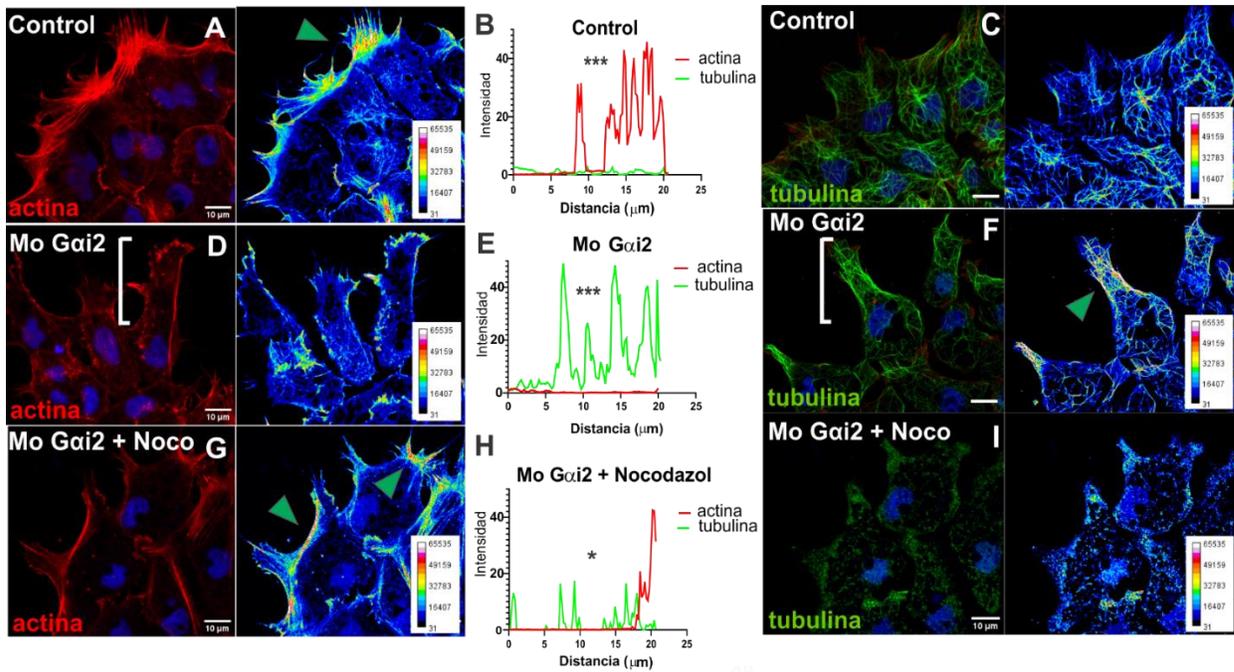


Figura 11. La pérdida de función de Gai2 altera la distribución del citoesqueleto de actina y tubulina en células de CNC, distribución que se restaura parcialmente con Nocodazol. Se explantaron células de CNC provenientes desde embriones Control y embriones microinyectados con morfolino de Gai2, los cuales fueron cultivados en matrices de fibronectina y se les realizó ensayos de inmunofluorescencia para visualizar F-actina y α -tubulina (A-F). Explantes morfantes también fueron tratados con 65 μ M de Nocodazol por 30 minutos para favorecer la despolimerización de los MTs para intentar rescatar la distribución de actina y tubulina (G-I). El morfolino de Gai2 afecta severamente la distribución de actina cortical e incrementa la distribución de tubulina hacia el borde director. (B, E, H) Cuantificación de la Intensidad de fluorescencia de actina y tubulina. (J) Representación esquemática de la cuantificación para la distribución de actina y tubulina desde el borde del núcleo a la corteza celular (A: actina, T: tubulina). Barras de Error: Error estándar *** $P \leq 0.001$, * $P \leq 0.1$. **Aumento: 40X.** Barra: 10 μ m (N experimental: Se analizaron 3 células por condición de 3 experimentos independientes)

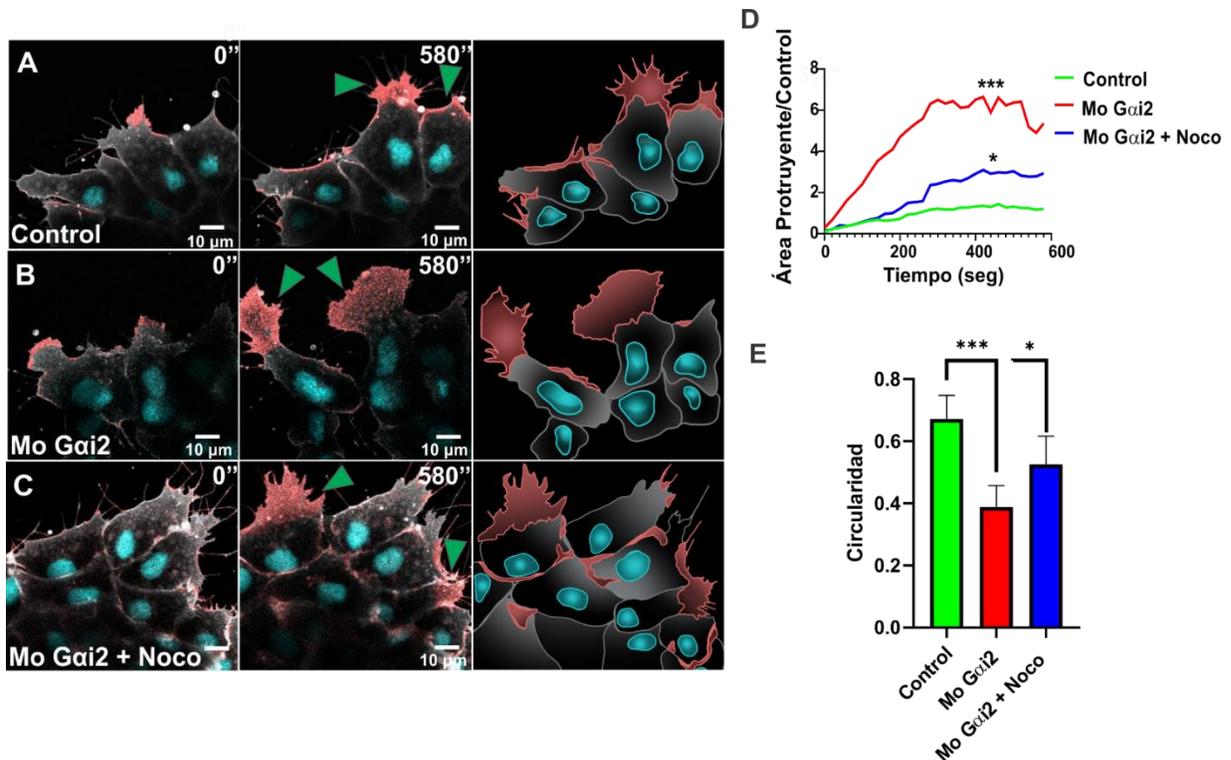


Figura 12. Nocodazol restaura parcialmente la morfología de células morfantas para Gai2 durante la migración de la CNC. La morfología celular se evaluó tras 10 minutos por microscopía confocal y “time lapse”. (A-C) Explantes de CNC fueron extraídos desde embriones de *Xenopus* en estadio 17, previamente inyectados con GFP de membrana e H2B cherry. Estos se incubaron sobre una placa de fibronectina y se realizó el seguimiento del cambio de morfología celular cada 20 segundos por 10 minutos totales. Las flechas verdes indican un aumento en el área protruyente en todos los casos. (D) A través de la sustracción de los períodos de cambio del área a la imagen en tiempo 0 se generaron imágenes de extensión celular en el tiempo, observándose un aumento significativo en el área protruyente en células morfantas para Gai2 con respecto a las células control, mientras que las células morfantas para Gai2 que fueron tratadas con Nocodazol restauran parcialmente la morfología celular, mostrando una disminución significativa en área protruyente en comparación a las células morfantas. (E) La circularidad se evaluó dibujando el perímetro celular en ImageJ, donde un número cercano a 1 se traduce en una mayor circularidad. La significancia fue evaluada con un test de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Barras de Error: Error estándar *** $P \leq 0.001$, * $P \leq 0.1$. **Aumento 40X.** Barra: 10 μm . Control n total = 10 explantes; Mo Gai2 n total = 10 explantes; Mo Gai2 + Nocodazol n total = 10 explantes.

III. **Gai2 es requerida para mantener la dinámica de los MTs durante la migración de la CNC en *Xenopus***

Durante la migración celular, los MTs son un componente fundamental para mantener la forma celular, regular la polaridad de proteínas que remodelan el citoesqueleto de actina, el ensamblaje y reciclaje de componentes de adhesión célula-célula y célula-matriz, y el transporte de diferentes cargos en todo el cuerpo celular. Debido a que se observaron diferencias notorias en la distribución de la tubulina en las células morfantes para Gai2, la cual se concentró hacia el borde director, se procedió a analizar **qué población de MTs se encuentra concentrada en la corteza celular.**

Los resultados mostraron un aumento significativo de tubulina acetilada (Fig. 13D), la cual constituye MTs más estables, mientras que las células controles mostraron menos tubulina acetilada en el borde director (Fig. 13A), lo que sugiere que estas células requieren MTs más dinámicos en esta zona, lo cual fue validado también mediante Western-blot (Fig. 13G-H). También se analizó la localización de Gai2 en relación a la localización de α -tubulina, mostrando que ambas proteínas se encuentran ubicadas en el mismo espacio subcelular (Fig. 13I-L), además de encontrarse formando parte de un mismo complejo de interacción (Fig. 13M) junto con otras proteínas de unión al extremo + de los MTs como EB1 (Fig. 13N) y EB3 (Fig. 13O), las cuales se unen a la tubulina para regular la dinámica de los MTs (las flechas blancas muestran las bandas de proteína correspondientes). Esta interacción sugiere una relación funcional entre Gai2 y proteínas de unión a extremo más que controlan la dinámica de los MTs, además del cambio tan drástico en la organización de la tubulina en condiciones morfantes para Gai2 (Fig. 11F) y el aumento de la tubulina estable hacia el borde director (13D).

A continuación, buscamos validar si Gai2 regula la dinámica de los MTs durante la migración de la CNC. Para responder a esto, etiquetamos las células de CNC con EB3-GFP, una proteína de unión a MTs en el extremo + fusionada a GFP, y capturamos imágenes en un microscopio confocal Leica SP8, lo que permite la visualización en alta resolución de MTs en crecimiento. Realizamos un seguimiento

de los cometas EB3-GFP cada 3 segundos y cada 1.5 segundos, y comparamos la velocidad de crecimiento de los MTs, su longitud de crecimiento, el tiempo de vida de los cometas y las pausas experimentadas, mediante cuantificación automática utilizando el software PlusTipTracker para Matlab (Applegate y col. 2011), de manera de realizar un análisis exhaustivo de la dinámica de los cometas, el cual fue previamente validado en el modelo de CNC en *Xenopus* (Moore y col., 2013).

Estos cometas se clasificaron como lentos o rápidos y de corta o larga duración basado en la velocidad promedio de crecimiento ($11\mu\text{m}/\text{minuto}$) y el tiempo de vida de los cometas (23 segundos) del conjunto de datos.

Gracias a estos análisis observamos que la inhibición de la expresión de *Gai2* redujo la proporción de MTs rápidos de corta duración en favor de MTs más lentos, de corta y larga duración (Fig. 14A-C). Por lo tanto, los MTs de células morfantes crecen más lentamente que los MTs de células controles. Más en detalle, gracias al software PlusTipTracker encontramos que la velocidad de crecimiento de los cometas en las células morfantes para *Gai2* es significativamente más lenta ($8.52\mu\text{m}/\text{min}$) en comparación con las células controles ($10.53\mu\text{m}/\text{min}$) (Fig. 14D). Estos resultados dan cuenta de que **los MTs provenientes de células morfantes para *Gai2* son menos dinámicos** (lo que concuerda con un aumento de tubulina acetilada en condiciones morfantes para *Gai2*). Cabe destacar que no observamos diferencias significativas, entre las células controles y las células morfantes para *Gai2*, en el número de pausas que experimentan los cometas de EB3-GFP (Fig. 14E).

Por otro lado se calculó el porcentaje de catástrofes de los MTs de manera manual mediante el plugin MtrackJ de ImageJ. Para estos efectos comparamos el número total de MTs en catástrofe (cometas que desaparecen) con el número total de MTs (cometas) en el borde libre y en el contacto célula-célula mediante el seguimiento de la proteína EB3-GFP. En las células controles, los MTs en el contacto célula-célula experimentaron un porcentaje mayor de catástrofes (Fig. 14F) en comparación con los MTs en el borde director, mientras que al silenciar *Gai2* el porcentaje de catástrofe fue significativamente menor en el contacto célula-célula que en las células controles (Fig. 14F). Esto sugiere que *Gai2* es requerida para

promover la catástrofe de los MTs durante la migración de células de la CNC de *Xenopus*, lo que se condice con una disminución en la dinámica de los MTs.

Gracias a todos estos resultados podemos concluir que Gai2 cumple un papel crucial en modular la dinámica de los MTs durante la migración celular, ya que en condiciones de disminución de la expresión de Gai2, los MTs son **más estables en el tiempo, menos dinámicos** y ocurren **menos catástrofes** en comparación con las células controles.

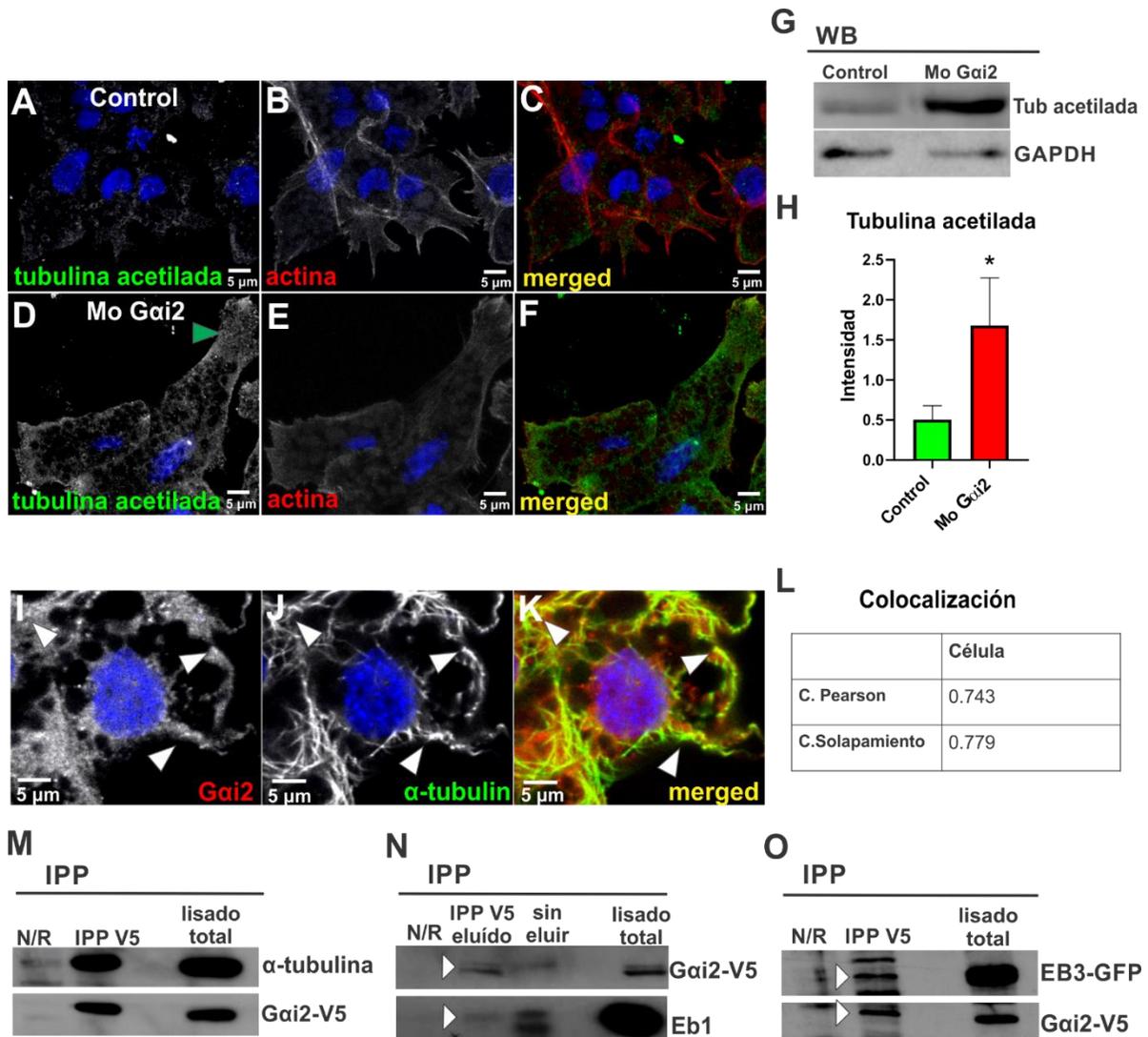


Figura 13. Las células morfantas para Gai2 muestran un aumento en la tubulina estable y Gai2 interacciona con diferentes componentes de la dinámica de los MTs. (A-F) Inmunofluorescencia contra tubulina acetilada (verde) y actina (rojo) en células controles y células morfantas para Gai2. **Aumento 40X.** La disminución de la expresión de Gai2 provoca un aumento en la localización de la tubulina acetilada hacia el borde director, además de un aumento en la cantidad de tubulina acetilada en comparación a las células controles, analizado mediante Western Blot (G-H). (I-L) Inmunofluorescencia contra Gai2 y α -tubulina muestra que ambas proteínas se encuentran co-localizando. **Aumento 63X.** Barra: 5 μ m. (M-O) Ensayos de coimmunoprecipitación muestran que Gai2 se encuentra interaccionando con α -tubulina, y con proteínas de unión a extremo “más” de los MTs EB1 y EB3, posiblemente regulando su dinámica de crecimiento. La colocalización de las proteínas se analizó mediante el software JACoP de Image cuyo coeficiente de Pearson fue de 0.743, mientras que el coeficiente de solapamiento fue de 0.779. n total = 3 lisados por condición.

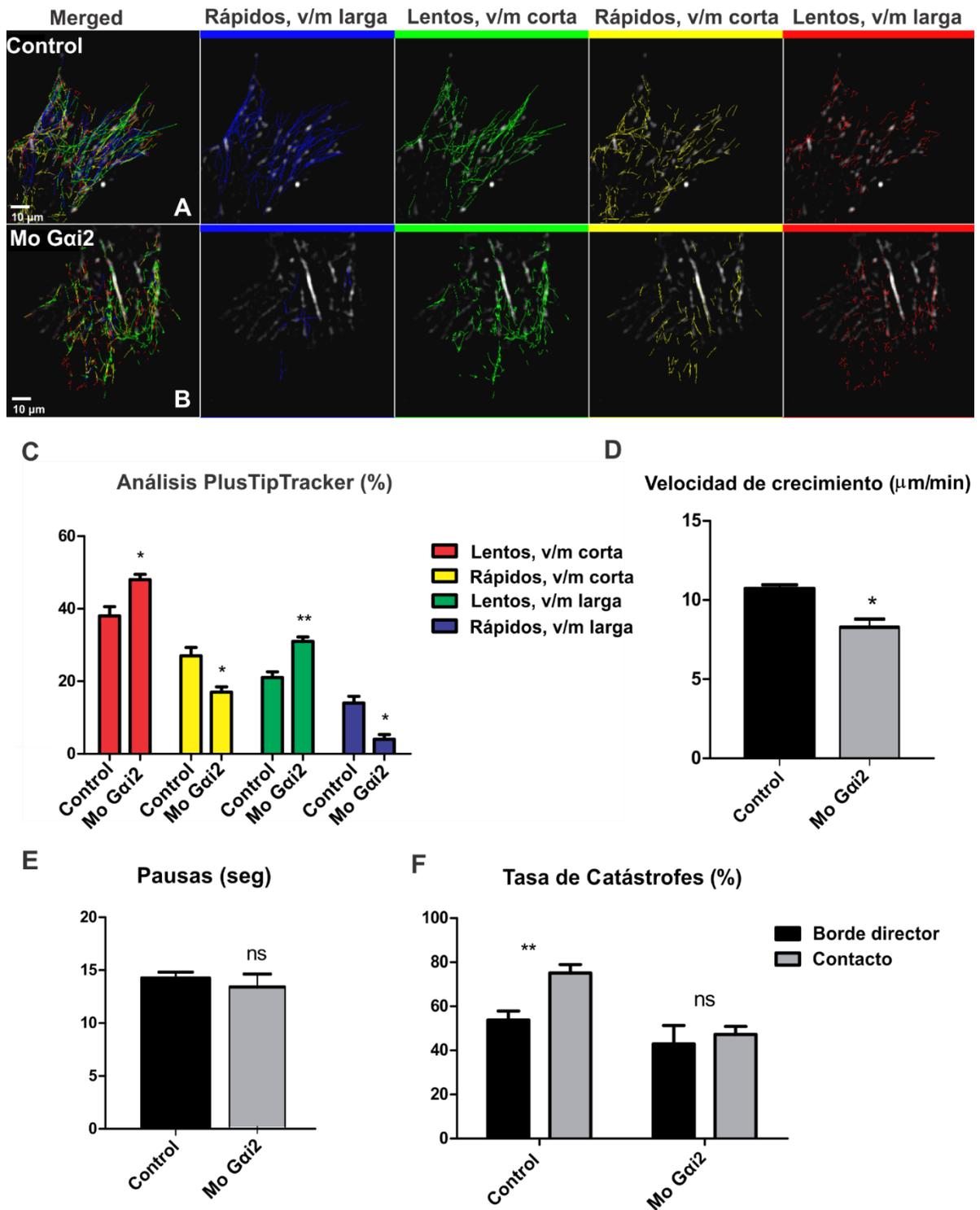


Figura 14. Las células morfantes para Gai2 tienen MTs menos dinámicos en comparación a las células control. (A-B) Se obtuvieron imágenes cada 2 segundos por 5 minutos totales mediante microscopía confocal Leica SP8. Los videos de las células

marcadas con EB3GFP fueron recortados a una región de interés. Se les aplicó una reducción de ruido y se les removió el fondo desde ImageJ, y se les aplicó un algoritmo de diferencia de gaussianos (DoG) para resaltar los cometas en crecimiento. (C) Los videos se analizaron a través de Matlab utilizando el software plusTipTracker para detectar y analizar los extremos en crecimiento de los MTs a través del seguimiento de proteínas +TIP (Applegate y col., 2011). Se utilizó un script que probó cientos de parámetros de detección de los cometas para seleccionar la configuración óptima para el análisis. Los parámetros de plusTipGetTracks determinados en este trabajo fueron: Search Radius Range (pixels) 5-12, Minimum Sub-Track Length (frames) 3; Max Gap Length (frames) 8; Max Shrinkage Factor 0,8; Max angle Forward 40; Max angle Backward 10; Fluctuation Radius 2,2. Luego de analizar cada región de interés en los videos de 5 minutos de duración, se realizó un análisis estadístico ANOVA para múltiples condiciones y Test T-Student (de dos colas) para comparar las diferencias significativas en distintas condiciones. Las células se separaron en cuatro grupos en función de la velocidad de crecimiento (lento <11 $\mu\text{m}/\text{minuto}$ <rápido) y la duración (de corta duración < 23 segundos <de larga duración). Las células inyectadas con morfolino de Gai2 tienen un porcentaje mayor de MTs lentos de corta y larga duración, y un porcentaje menor de MTs rápidos de corta y larga duración en comparación a las células control. (D) La velocidad promedio de crecimiento de los MTs morfantes para Gai2 es de 8.52 $\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.301$ y es significativamente menor en comparación a las células control, cuya velocidad de crecimiento es en promedio 10.53 $\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.297$. (E) La cuantificación de las detenciones (pausas) de los cometas no arrojó diferencias significativas entre células control y células morfantes para Gai2. (F) Utilizando el plugin MtrackJ de ImageJ se marcó manualmente la trayectoria de los cometas en el tiempo, específicamente de aquellos que entran o salen de una región de interés pre-establecida en el contacto célula-célula y en el borde director. Al término de los 2.5 minutos se hizo una relación entre los cometas que permanecen en la zona versus los cometas totales que entraron al área. De esta relación se obtuvo el porcentaje de cometas que permanecen estables y la diferencia correspondió por lo tanto a los cometas que desaparecieron (cometas que entraron en catástrofe):

$$\% \text{ cometas estables} = \frac{\text{cometas que permanecieron en la zona rectangular}}{\text{cometas totales}} \times 100$$

$$100\% - \% \text{ cometas estables} = \% \text{ catástrofes}$$

Los resultados se graficaron para comparar las catástrofes que ocurren en el borde director de células control o morfantes versus aquellas que ocurren en el contacto célula-célula en ambas condiciones. Las células control muestran un % de catástrofes de 53,8% en el borde director y un 75,1% en el contacto célula-célula. Por otro lado, las células morfantes para Gai2 muestran un % de catástrofes de 42.9% en el borde director y de sólo un 47.3% en el contacto célula-célula. Para evaluar su significancia estadística se aplicó test ANOVA y t-student. N = 3 experimentos por condición. **Aumento: 63X**. Barra: 10 μm .

IV. Nocodazol rescata la migración en células morfantes para Gai2 a través de la despolimerización de los MTs

Como bien sabemos, el crecimiento de los MTs podría promover directamente la formación del lamelipodio y, por lo tanto, ser necesario para la estabilización selectiva de un borde director para mantener un movimiento dirigido de la célula durante el proceso de migración. En este sentido, sugerimos que los niveles de tubulina estable deben regularse cuidadosamente para tener una polarización adecuada de la célula, que le permita migrar y cambiar dinámicamente de dirección en la migración en procesos como “Inhibición de la locomoción por contacto” (CIL). Estudios realizados por Rachel Moore y colaboradores en 2013 mostraron que la catástrofe de MTs es un proceso esencial durante CIL en la migración de las células de CNC en *Xenopus*.

Anteriormente ya comprobamos que las células morfantes para Gai2 poseen más tubulina acetilada que las células controles, además de mostrar un % de catástrofes reducido en el contacto célula-célula y una dinámica de MTs más lenta en comparación a las células controles. Con el fin de analizar en más detalle si Gai2 regula la migración de las células de la CNC a través del control de la dinámica de los MTs, intentamos rescatar el fenotipo morfante de Gai2 usando una concentración baja de Nocodazol (65 nM). Nocodazol corresponde a una molécula que interfiere en la dinámica de ensamble y desensamble de los MTs, el cual mostró tener un efecto parcial sobre la despolimerización de los MTs y ningún efecto sobre la dispersión de las células controles (Fig. 15D). Por otro lado, en un contexto morfante de Gai2, donde hemos descrito que el morfolino de Gai2 bloquea la dispersión de las células de CNC (Fig. 15B); el tratamiento de las células morfantes con una concentración de 65 nM de Nocodazol rescató la dispersión celular de manera eficiente (Fig. 15C, 15E). Curiosamente, el tratamiento de las células controles con 65 nM de Nocodazol no mostró diferencias significativas en el grado de dispersión de las células, lo que sugiere que la despolimerización de los MTs es crucial para la migración celular.

Estos resultados evidencian que **se necesitan niveles controlados de polimerización y despolimerización de la tubulina para promover la migración de las células de CNC.**

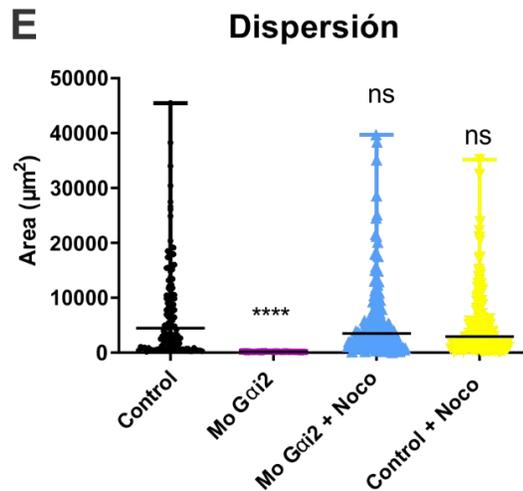
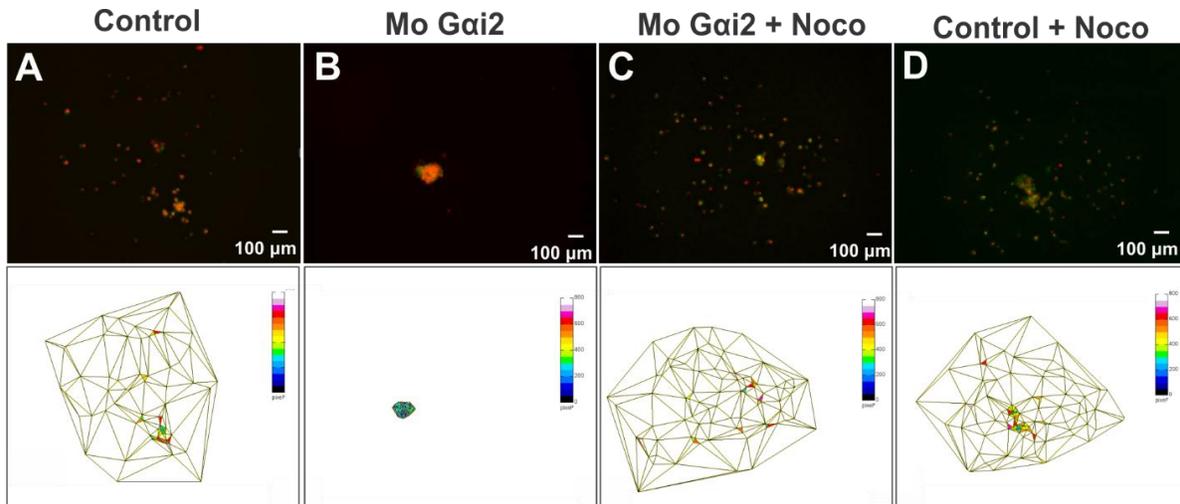


Figura 15. El tratamiento con Nocodazol de células morfantas para Gai2 restaura la migración radial de las células de CNC. (A-D) Explantes de CNC fueron extraídos desde embriones de *Xenopus* en estadio 17, previamente inyectados. Estos se incubaron sobre una placa de plástico con fibronectina y la dispersión de las células de cada condición fue evaluada durante 10 horas a través “time-lapse”. Todos los embriones fueron co-inyectados con H2B-Cherry y GFP de membrana para seguimiento individual de la célula y cuantificación de la dispersión. Se evaluaron cuatro condiciones: Control, Morfolino contra Gai2, Morfolino contra Gai2 + 65 nM de Nocodazol y Control + 65 nM de Nocodazol. Bajo cada imagen representativa se muestra la triangulación de Delaunay en cada condición en el tiempo final (10 horas). (E) El radio entre las áreas promedio correspondientes al tiempo final fueron graficados a las 10 horas. Se evaluó la significancia con un test de Mann-Whitney para datos no paramétricos (****, $p < 0,0001$). Barras de error: Error estándar. **Aumento 10X.** Barra: 10 µm. Control n total = 21 explantes; MO Gai2 n total = 24 explantes; MO Gai2 + 65 nM Nocodazol = 36 explantes; Control + 65 nM Nocodazol = 30 explantes; 3 ensayos. Los experimentos fueron realizados en *Xenopus laevis*.

V. **Gai2 es requerida para mantener la dinámica de las adhesiones focales durante la migración de la CNC en *Xenopus***

Como se vio en resultados anteriores, las células morfantes para Gai2 presentan defectos en la migración y muestran cambios evidentes en la morfología celular (principalmente en el área de sus protrusiones), además de presentar MTs más estables en el tiempo, lo cual podría estar relacionado con la dinámica y estabilidad de las adhesiones focales. Esta premisa suena bastante lógica si pensamos que los MTs son verdaderas “carreteras celulares”, ya que se encargan de transportar proteínas esenciales que participan en el ensamble y desensamble de las adhesiones célula-matriz.

Para evaluar la contribución de los MTs en la morfología y dinámica de las adhesiones focales, se realizó en primer lugar una inmunohistoquímica contra β -integrina y fosfopaxilina (P-Pax), ambas proteínas claves en el ensamblaje de las adhesiones focales, tanto en la condición control como en la condición morfante para Gai2. Se ha descrito que 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 mostraron adhesiones focales de mayor área, en comparación a células controles, las cuales son significativamente más pequeñas (Fig. 16A-F). Asimismo se evaluó la estabilidad de las adhesiones focales encontrándose una estabilidad en el tiempo significativamente mayor en las células morfantes para Gai2 (Fig. 16G-J) en comparación a las células controles, lo que sugiere que las integrinas y todas las proteínas adaptadoras que conforman la adhesión focal permanecen mucho más tiempo en el borde celular. Adicionalmente, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación entre Gai2 y $\alpha 5$ -integrina, las cuales según nuestros resultados forman parte de un complejo de interacción (Fig.16K). Estos resultados sugieren que las **células morfantes para Gai2 poseen una dinámica de desensamblaje más lenta de las adhesiones focales**, en contraste con las células controles, lo

que podría tener relación con el control que ejerce Gαi2 sobre la dinámica de los MTs.

Para evaluar la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de las AF dependiente de los MTs, ambas condiciones celulares (controles y morfantes para Gαi2) fueron sincronizadas con 65 μM de Nocodazol, de manera de fijar las adhesiones en la membrana celular al depletar a las células de la red de MTs. Posterior al tratamiento con Nocodazol, las células se lavaron para reestablecer la polimerización de los MTs (y con ello el transporte de diferentes cargos) y se fijaron a distintos tiempos para establecer una curva de la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales. A éstas se les realizó inmunofluorescencia contra P-pax y α-tubulina, y se analizó el área de las adhesiones focales en el tiempo.

En las células controles específicamente, se observa que a medida que aumentan los tiempos después de los lavados, el área de las adhesiones focales disminuye rápidamente a los 30 segundos (Fig. 17A-D). Asimismo, ya al minuto uno se obtuvo un aumento drástico en el área de las adhesiones focales (Fig. 17C-D, 17M barras verdes), lo que evidencia un período de ensamblaje y desensamblaje de 30 segundos cada uno. Muy por el contrario, las células morfantes para Gαi2 muestran una disminución en el área de las adhesiones focales recién a los 5 minutos, disminución que persiste hasta los 10 minutos (Fig. 17G-L, 17M barras rojas), evidenciando una “ventana” de más o menos 5 minutos en el período de desensamblaje, muy diferente a lo que ocurrió con las células controles cuya “ventana” sólo fue de 30 segundos entre un proceso y otro. Estos resultados muestran que **el proceso de desensamblaje de las adhesiones focales sería mucho más lento en las células morfantes para Gαi2 en comparación a las células controles** (Fig. 17M). Estos antecedentes, sumados a un aumento significativo en la estabilidad de las adhesiones focales en el tiempo (16I) nos llevan a concluir que Gαi2 regula la dinámica de desensamblaje de las adhesiones focales a través de los MTs, proceso que afectaría significativamente a la migración *in vitro* (Fig. 9). Este resultado, en conjunto con la disminución en la dinámica de los MTs (Fig. 14), la disminución significativa de la retracción celular y un aumento

significativo del área protruyente (Fig. 10), en condiciones de pérdida de función de Gai2 (Fig. 14), sugieren una posible función de Gai2 sobre las proteínas G pequeñas de la familia Rho.

Por lo tanto, ya que la polimerización de actina y la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de adhesiones focales se encuentra regulada por las proteínas RhoA y Rac1 (cita), nuestro siguiente paso fue analizar la localización subcelular de ambas proteínas en un contexto normal y en la condición morfante para Gai2, así como también la localización de otras proteínas que regulan la polaridad celular como Par3 y ζ PKC, y su relación con Gai2.

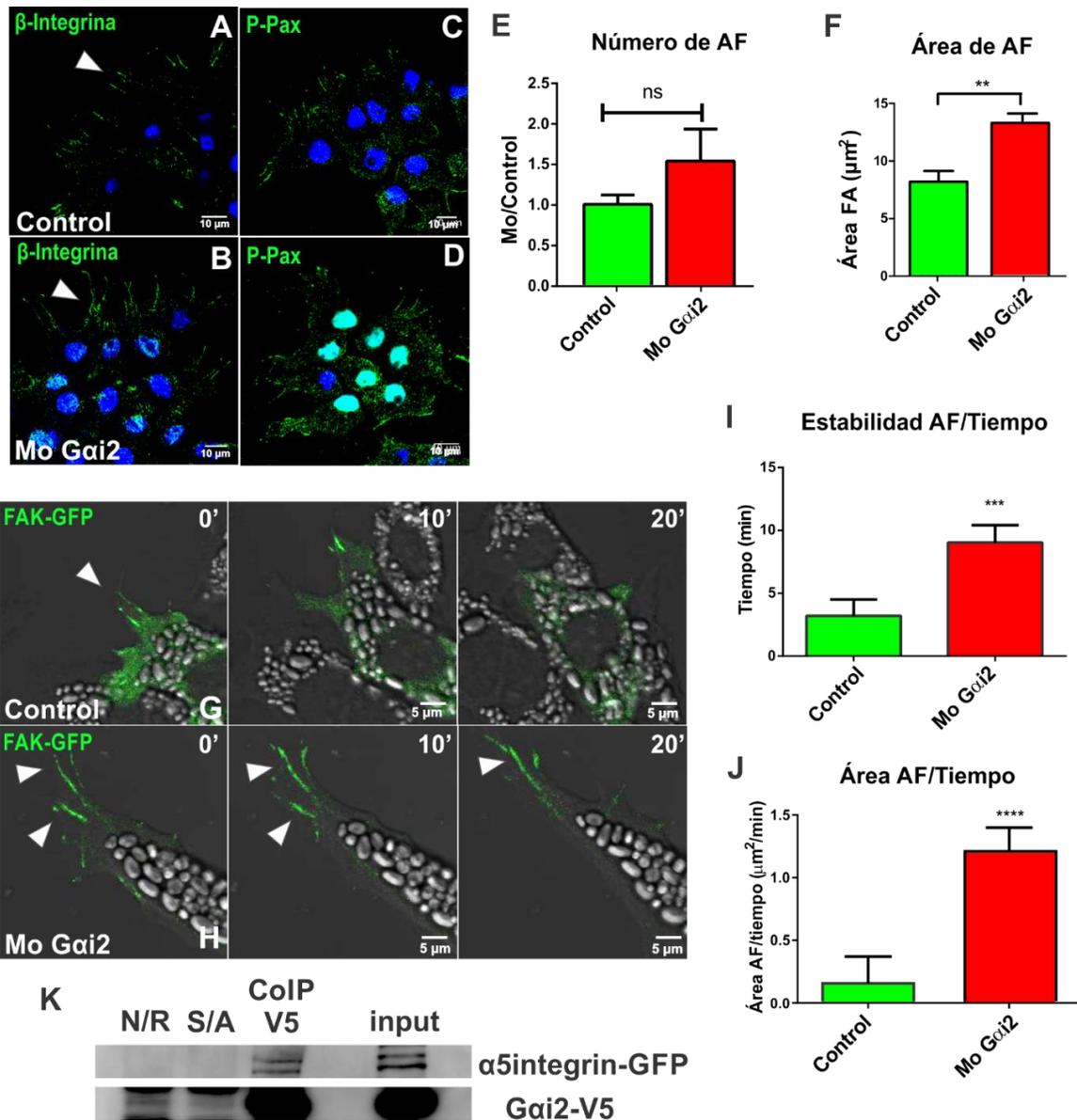


Figura 16. Las células morfantes para Gai2 poseen adhesiones focales más grandes y más estables en el tiempo que las células controles. (A-D) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. En verde se observan las adhesiones focales de células controles (A, C) y células morfantes para Gai2 (B, D), visualizadas con anticuerpo anti β -integrina y P-Pax. **Aumento: 40X.** Barra: 10 μ m. En (E) se observa la cuantificación del número de adhesiones focales y en (F) el área de adhesiones focales de las células en las condiciones de estudio. Análisis estadístico mediante t-student (**, $p < 0,01$; n explantes: 43). (G-H) Imágenes obtenidas mediante “time lapse” de microscopía confocal. En verde se observa FAK-GFP. **Aumento: 63X.** Barra: 5 μ m. (I-J) Medidas de la variación del área en el tiempo y de la estabilidad de las AF. En ambos casos las células morfantes para Gai2 poseen una estabilidad mayor en el tiempo, en comparación a las células controles. Análisis estadístico mediante t-student (*, $p < 0,1$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; n explantes: 11). (K) Co-inmunoprecipitación de Gai2-V5 con $\alpha 5$ Integrin-GFP. S/A: Sin anticuerpo; N/R: anticuerpo no relacionado; input: lisado total.

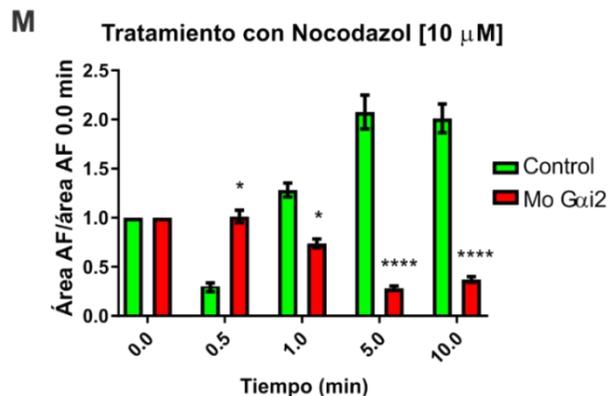
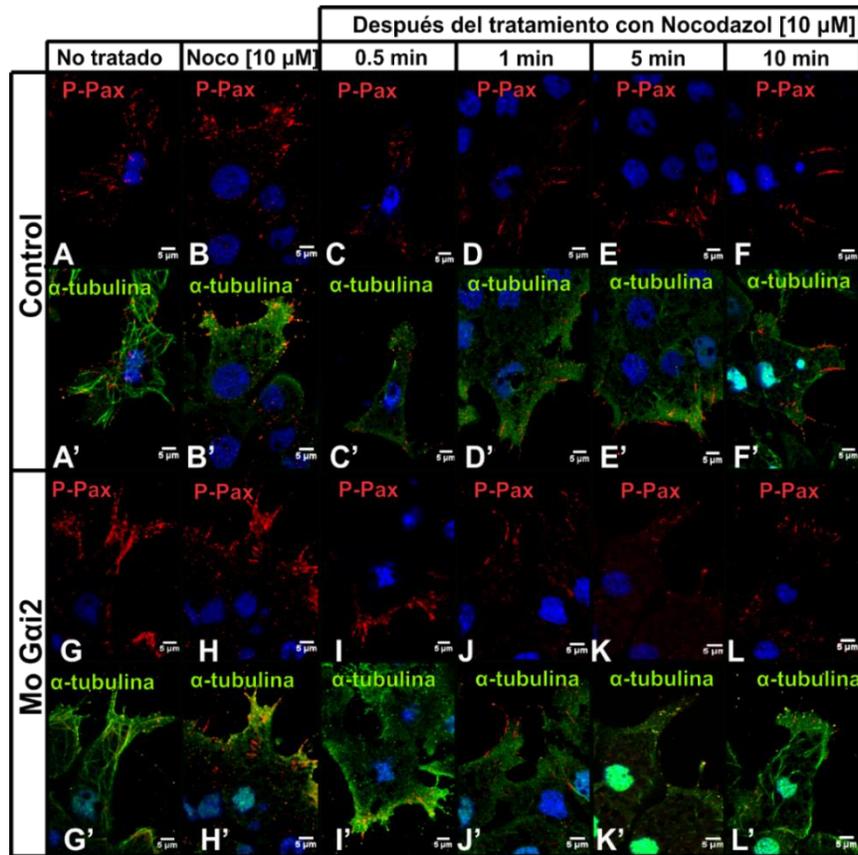


Figura 17. Las células morfantas para Gai2 poseen una dinámica de desensamblaje de las adhesiones focales más lenta que las células controles. (A-L) Inmunofluorescencia usando anticuerpo anti P-Pax (rojo) y α -tubulina (verde) en explantes controles versus explantes morfantas para Gai2 previo tratamiento con Nocodazol [10 μ M]. La pérdida de función de Gai2 muestra un aumento en el área de las adhesiones focales y una disminución en la dinámica de desensamblaje de adhesiones focales posterior al tratamiento con Nocodazol. $n = 27$ (n° de explantes), $N = 3$ (réplicas experimentales). (M) Gráfico normalizado donde se observa un retraso en el desensamblaje de las adhesiones focales (5 minutos) en condiciones morfantas de Gai2, en comparación a las células controles las cuales desensamblan al 30 segundos, posterior al tratamiento con Nocodazol. Error estándar, * $p < 0.1$, **** $p < 0.0001$. $n = 27$ (n° de explantes), $N = 3$ (réplicas experimentales). **Aumento: 63X.** Barra: 5 μ m.

VI. Gai2 es requerida para mantener la polaridad celular durante la migración de la CNC en *Xenopus*

En la última década, los MTs han emergido como componentes moleculares importantes en el control de la migración celular, a través de la regulación de una serie de eventos celulares, entre ellos el tráfico celular, la morfología celular y la polaridad (Etienne-Manneville, 2013). Por ejemplo, alteraciones en la polimerización de los MTs alteran la formación de lamelipodios a través de la inhibición de Rac1 (Laan, y col., 2008; Waterman-Storer y col., 1999).

Con el fin de continuar dilucidando el mecanismo funcional de Gai2 en la migración de las células de la CNC, nos preguntamos si se requiere Gai2 para establecer una correcta polarización durante la migración de células de la CN. Varios trabajos proponen que todas las isoformas de Gai controlan la dinámica del huso mitótico y, por lo tanto, la división celular asimétrica y la polaridad celular desde invertebrados hasta mamíferos (Siller y col., 2009; Williams y col., 2014; Villaseca y col., 2022). Por lo tanto, a continuación, investigamos si Gai2 regula la polaridad celular evaluando el efecto de la pérdida de función de ésta sobre proteínas de polaridad celular como Par3 y ζ PKC en explantes de CNC. Comenzando con la premisa de que Par3 controla la migración de células de la CN a través de la catástrofe de MTs durante CIL (Moore y col. 2013) y que ζ PKC es un marcador apical, realizamos ensayos de inmunofluorescencia contra ambas proteínas. En las células controles se observa a Par3 mayoritariamente localizada en el contacto célula-célula y a ζ PKC en el borde director (Fig. 18A, 18C). Muy por el contrario, en explantes morfantes para Gai2 observamos una deslocalización de ambas proteínas (Fig. 18B, 18D), con una disminución en la intensidad de fluorescencia de ambas (Fig 18E, 18F) lo que sugiere un efecto severo sobre la polaridad celular en condiciones de disminución de la expresión de Gai2. Además, la proteína Gai2 y ζ PKC se encuentran formando parte de un complejo de interacción, tal como se muestra en la figura 18G, lo que revela una relación funcional entre Gai2 y el correcto establecimiento de la polaridad celular durante la migración de la CNC.

Por otro lado, también analizamos la localización de las formas activas de Rac1 y RhoA en explantes de CNC en condiciones de pérdida de función de Gai2, ya que ambas proteínas cumplen una función fundamental en la migración de la CNC y en CIL (Carmona-Fontaine y col., 2011; Moore y col., 2013). Para esto se inyectó ARNm de sondas de estas proteínas que corresponden a los dominios de unión de los efectores Pak1 (efector de Rac1) y Rhotekin (efector de RhoA) fusionados a la proteína GFP, con el fin de detectar las conformaciones activadas, es decir, unidas a GTP de estas proteínas. Los explantes de CNC se cultivaron en fibronectina y la localización de cada GTPasa activa se controló mediante microscopía confocal en célula viva. Como describió previamente Carmona-Fontaine y col. (2011) en las células de CNC controles, Rac1 activa se localiza en el borde libre de la célula hacia la dirección de la migración, y su actividad se inhibe en el contacto célula-célula ya que aumenta RhoA (Fig. 19A-C flechas blancas, Fig. 19I-K, flecha blanca). Muy por el contrario, las células morfantes para Gai2 no pueden migrar o separarse de los explantes, y en comparación con los controles, las células morfantes para Gai2 presentan mayor localización de la proteína Rac1 activa en las protrusiones, incluso en el contacto célula-célula donde deberíamos localizar a RhoA (Fig. 19L-M, Fig. 19Q). De hecho, se observó un cambio notable también en la localización de la proteína RhoA activa, la cual se localiza ahora hacia el borde director de las células (Fig. 19D-F flechas blancas), muy diferente a las células controles, donde se localiza hacia el borde posterior o contacto célula-célula (Fig. 19B-C). Además, realizamos ensayos de inmunofluorescencia contra la fosforilación en Serina 19 de la cadena liviana de la Miosina para estudiar la activación de la vía ROCK, encontrándose que en células morfantes para Gai2, pMLC se encuentra concentrada hacia la corteza celular (Fig. 19H), mientras que en las células de CNC controles pMLC se localiza de manera puntiforme hacia el centro de la célula, en el borde posterior el cual es conocido como borde retráctil (Fig. 19G), lo que **podría sugerir una disminución severa en la contracción celular y la fuerza de tracción que permiten la migración de las células de la CNC**. Este resultado se condice con los hallazgos de una disminución en el área de retracción y en la velocidad de retracción de las protrusiones de las células morfantes para Gai2 (Fig. 10D, Fig. 10F), lo que tendría

relación con un cambio en la fuerza de tracción celular que dificulta la retracción de la célula, promovida por pMLC.

Debido a que la polimerización de los MTs activa localmente a Rac1, lo que conduce a un aumento en la actividad de Rac1 hacia las protrusiones (Waterman-Storer y col., 1999), quisimos probar si Nocodazol como droga depolimerizante de los MTs es capaz de rescatar los niveles de Rac1 activos en células morfantes para Gai2. Tal como se observa en los resultados en la Figura 19R y Figura 19S, Nocodazol reestablece los niveles de Rac1 activos en las células morfantes para Gai2, probablemente porque la despolimerización de MTs libera más RhoA activa (Bershadsky y col., 1996). Todos estos resultados muestran que **Gai2 regula la polarización durante la migración de las células de la CNC**, ya que todos los marcadores analizados cambiaron su localización subcelular al disminuir los niveles de Gai2, lo que podría estar relacionado a la alteración de la red de MTs, y con ello probablemente al transporte correcto de estas proteínas de polaridad celular.

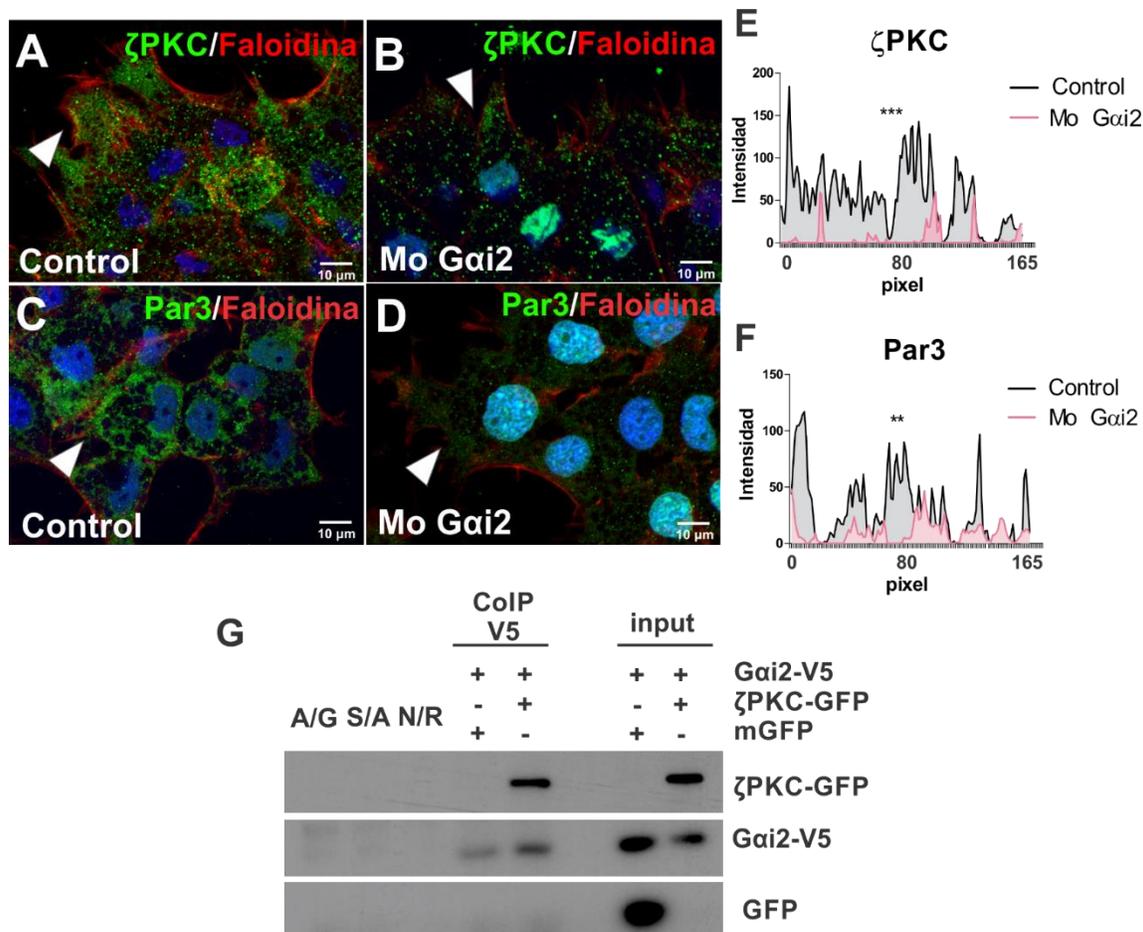
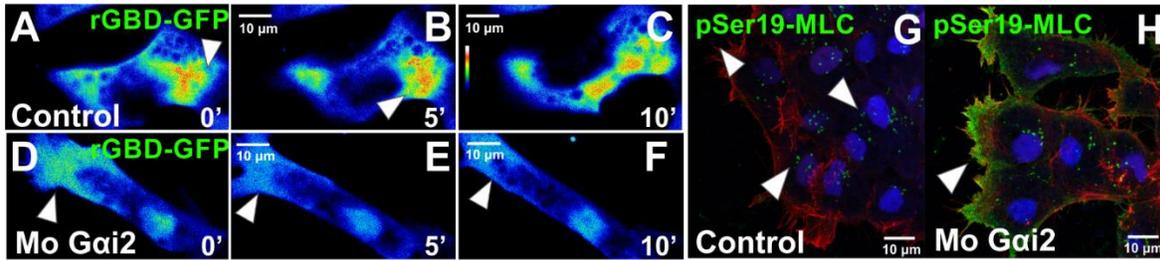
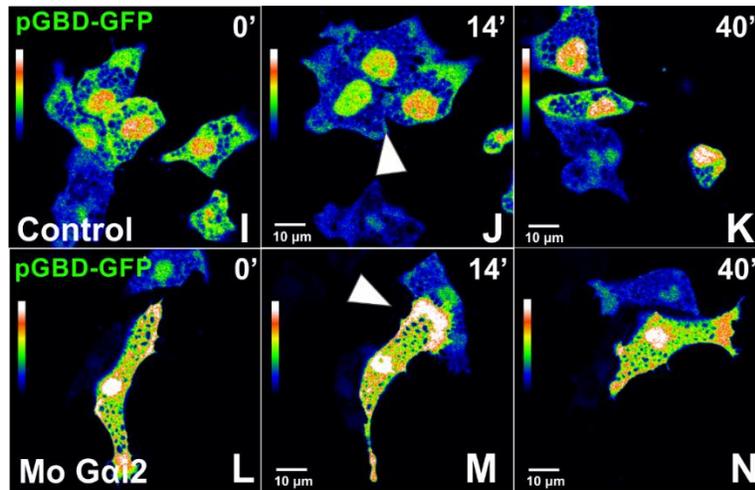


Figura 18. Las células morfantas para Gai2 pierden la localización normal de proteínas de polaridad celular como ζPKC y Par3. (A-B) Inmunofluorescencia contra ζPKC en células controles y células morfantas para Gai2. En verde se observa la proteína endógena ζPKC principalmente concentrada hacia el borde libre de las células (cabeza de flecha) en la condición control. En azul observamos DAPI para tinción de núcleos y en rojo faloidina. Las células morfantas para Gai2 además se co-inyectaron con H2B GFP para la detección de las células que recibieron el morfolino de Gai2. (C-D) Inmunofluorescencia contra Par3 en células controles y células morfantas para Gai2. En verde se observa la proteína endógena Par3 principalmente concentrada en el contacto célula-célula de los explantes (cabeza de flecha) en la condición control. En azul observamos DAPI para tinción de núcleos y en rojo faloidina. Al igual que en el caso anterior, las células morfantas para Gai2 además se co-inyectaron con H2BGFP para la detección de las células que recibieron el morfolino de Gai2. (E-F) Gráficos de intensidad de fluorescencia para las proteínas Par3 y ζPKC. La intensidad de fluorescencia de ambas proteínas en condiciones morfantas para Gai2 es menor en comparación a las células control observándose una pérdida de la localización normal de estas proteínas. La significancia fue evaluada con un test de Mann-Whitney para datos no paramétricos (***, $p < 0,001$). Barras de error. Error estándar. **Aumento: 63X.** Barra: 10 μm. (G) Co-inmunoprecipitación de Gai2-V5 con ζPKC-GFP. S/A: Sin anticuerpo; N/R: anticuerpo no relacionado; A/G: proteína A/G agarosa; input: lisado total. Imagen seleccionada de n replicas.

RhoA activo



Rac1 activo



Rescate con Nocodazol

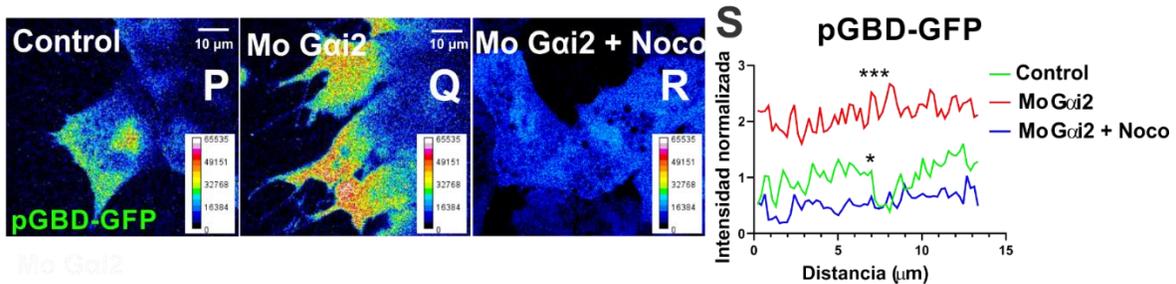


Figura 19. Las proteínas Rac1 y RhoA activas cambian su localización bajo condiciones de disminución de la expresión de Gai2 y Nocodazol rescata el fenotipo morfante para Gai2. (A-F) Escala de pseudocolor para la visualización de cambios en la localización de proteínas fluorescentes en explantes provenientes de embriones coinyectados con la sonda rGBD-GFP. Esta sonda contiene el dominio de unión de la proteína efectora Rhotekin a RhoA-GTP fusionado a GFP, lo que permite observar la localización de RhoA activa en el tiempo. En las células control se puede observar la localización de RhoA activa concentrada hacia el borde posterior (contacto célula-célula). En condiciones morfantes para Gai2 se observa a RhoA activa más concentrada hacia el borde director (borde libre de células). (G-H) Inmunofluorescencia contra pSer19MLC para observar la localización de los efectores de la vía ROCK. En las células controles se observa una localización puntiforme de pMLC hacia el centro y el borde posterior de la célula, mientras

que en las células morfantes para Gai2 pMLC se concentra hacia la corteza celular, específicamente hacia el borde director de las células. (I-N) Escala de pseudocolor para la visualización de cambios en la localización de Rac1 activa a través de la sonda **pGBD-GFP**. Esta sonda contiene el dominio de unión de la proteína efectora PAK1 a Rac1-GTP fusionado a GFP, lo que permite observar la localización de Rac1 activa en el tiempo. En las células controles se puede observar que Rac1 se localiza hacia el borde director y que se “apaga” cuando las células colisionan durante CIL (flecha blanca), activándose en el borde libre. En las células morfantes para Gai2 vemos que Rac1 se localiza activa en toda la célula, y se “enciende” cuando las células colisionan durante CIL (flecha blanca). (P-R) Escala de pseudocolor para la visualización de Rac1 activo a través de la sonda **pGBD-GFP**, bajo tratamiento con Nocodazol. En células controles se visualiza a Rac1 activo concentrado hacia el borde libre, mientras que en las células morfantes para Gai2 se ve concentrada en un área mucho mayor al de las células controles, abarcando todo el lamelipodio y hacia el centro de la célula. (R-S) Cuando las células son tratadas con 10 μ M de Nocodazol como droga despolimerizante de MTs, se observa un rescate parcial en la distribución de Rac1 activa, disminuyendo su intensidad de fluorescencia en comparación a la condición morfante para Gai2. **(S)** Gráfico de intensidad de fluorescencia para la proteína Rac1 GTP, la cual en células morfantes para Gai2 es significativamente mayor en comparación a las células controles, mientras que el rescate con Nocodazol muestra una disminución en la intensidad de fluorescencia. La significancia fue evaluada con un test de Mann-Whitney para datos no paramétricos (***, $p < 0,001$). Barras de error. Error estándar. **Aumento: 63X**. Barra: 10 μ m (N experimental = 3)

VII. El inhibidor de Rac1, NSC23766, rescata la dinámica de los MTs en células morfantes para Gai2 y la isoforma constitutivamente activa de Rac1, RacV12, imita el fenotipo morfante de Gai2

Se ha descrito que Rac1 puede influir en la polaridad celular estabilizando los MTs, ya que favorece la polimerización de la tubulina (Pegtel y col., 2007; Wittmann y col., 2003) y asimismo, un aumento en la polimerización de los MTs aumenta la liberación de Rac1 activa (Waterman-Storer y col., 1999). Debido a que las células morfantes para Gai2 presentan más Rac1 activo que las células controles, y que la regulación de la actividad de Rac1 es un mecanismo candidato a través del cual Gai2 podría afectar a los MTs, nos propusimos estudiar si los niveles de Rac1 activos son cruciales para la estabilización de los MTs en células de la CNC. Para ello usamos una concentración baja del inhibidor farmacológico de Rac1, NSC23766 (20 nM). Este inhibidor fue capaz de rescatar la dinámica de los MTs en las células morfantes para Gai2 (Fig. 20A, 20C-D) y la catástrofe de los MTs en el contacto célula-célula (Fig. 20F), este último proceso necesario para CIL. Muy por el contrario, al sobreexpresar una forma constitutivamente activa de Rac1 (Rac V12) pudimos observar un fenotipo similar al obtenido con la inyección de morfolino contra Gai2, obteniendo una disminución severa en la dinámica de los MTs (Fig. 20B, 20C-D) y una disminución en el % de catástrofes en el contacto célula-célula (Fig. 20F).

Específicamente, las células inyectadas con la forma constitutivamente activa de Rac1 (Rac V12) tienen un porcentaje mayor de MTs lentos de corta y larga duración (al igual que células morfantes para Gai2), y un porcentaje menor de MTs rápidos de corta y larga duración en comparación a células controles (como se mostró en la Fig. 14) y a las células inyectadas con morfolino de Gai2 que fueron tratadas con 20 nM de NSC23766 (inhibidor de Rac1). Más específicamente, la velocidad promedio de crecimiento de los MTs en células que expresan la forma constitutiva activa de Rac, Rac V12, es de $8.33 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.311$ y es significativamente menor (Fig. 20D) en comparación a las células controles (Fig. 14) y a las células morfantes

para Gai2 tratadas con 20 nM de NSC23766, cuya velocidad de crecimiento es en promedio $10.91 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.32$ (Fig. 20D). Todos estos antecedentes nos sugieren que **Gai2 estaría regulando la dinámica de los MTs a través del control de la proteína G pequeña Rac1 activa**, por lo que sería interesante evaluar si la disminución de Rac1 activa es capaz de rescatar la migración de las células de la CNC en condiciones morfantes para Gai2.

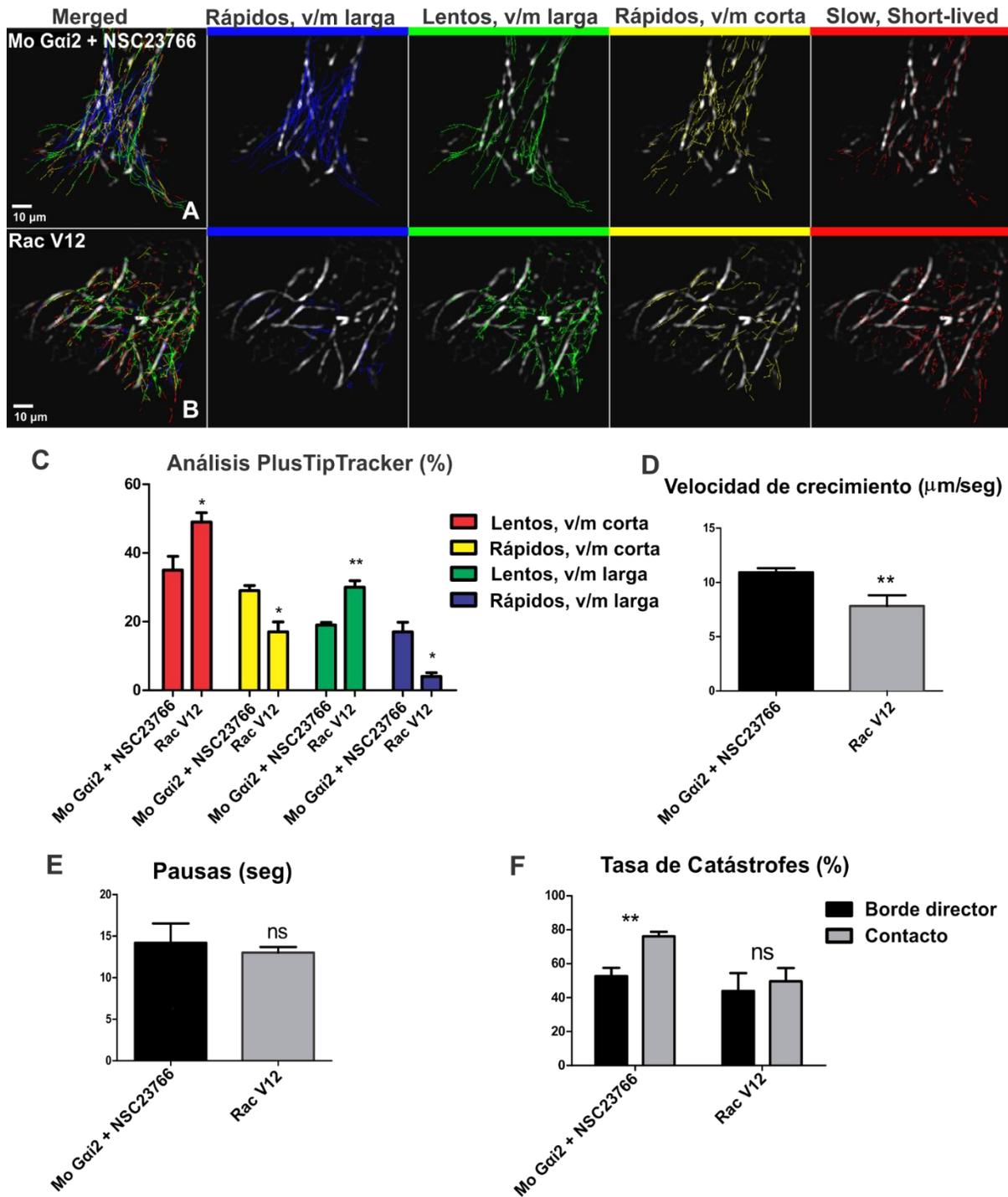


Figura 20. NSC23766 rescata la dinámica de los MTs en explantes tratados con morfolino de Gai2 y RacV12 imita el fenotipo morfante de Gai2. (A-B) Se obtuvieron imágenes cada 2 segundos por 5 minutos totales mediante microscopía confocal en célula viva. Los videos de células marcadas con EB3GFP fueron recortadas a una región de interés. Se les aplicó una reducción de ruido y una remoción del fondo desde ImageJ, y se les aplicó un algoritmo de diferencia de gaussianos (DoG) para resaltar los cometas en crecimiento. (C) Los videos se analizaron en MATLAB utilizando el software PlusTipTracker

para detectar y analizar los extremos en crecimiento de los MTs +TIP (Applegate y col., 2011). Se utilizó un script que probó cientos de parámetros de detección de los cometas para la selección de la configuración óptima para el análisis. Los parámetros de plusTipGetTracks determinados en este trabajo fueron: Search Radius Range (pixels) 5-12, Minimum Sub-Track Length (frames) 3; Max Gap Length (frames) 8; Max Shrinkage Factor 0.8; Max angle Forward 40; Max angle Backward 10; Fluctuation Radius 2.2. Luego de analizar cada región de interés en los videos de 5 minutos de duración, se realizó un análisis estadístico ANOVA para múltiples condiciones o Test T-Student (de dos colas) para comparar diferencias significativas en distintas condiciones. Las células se separaron en cuatro grupos en función de la velocidad de crecimiento (lento <11 μm / minuto <rápido) y la duración (de corta duración <23 segundos <de larga duración). Las células inyectadas con la forma constitutivamente activa de Rac1 (RacV12) tienen un porcentaje mayor de MTs lentos de corta y larga duración (al igual que células morfantes para Gai2), y un porcentaje menor de MTs rápidos de corta y larga duración en comparación a células controles (como se mostró en la Fig. 10) y a las células inyectadas con morfolino de Gai2 que fueron tratadas con 20 nM de NSC23766 (inhibidor de Rac1). (D) La velocidad promedio de crecimiento de los MTs en células que expresan RacV12 es de 8.33 $\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.311$ y es significativamente menor en comparación a las células controles (Fig. 10) y a las células morfantes para Gai2 tratadas con 20 nM de NSC23766, cuya velocidad de crecimiento es en promedio 10.91 $\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.32$. (E) La cuantificación de las detenciones (pausas) de los cometas no arrojó diferencias significativas entre las células morfantes para Gai2 tratadas con el inhibidor de Rac1 y las células que expresan la proteína constitutivamente activa de Rac. (F) Utilizando el plugin MtrackJ de ImageJ se marcó manualmente la trayectoria de los cometas en el tiempo, específicamente de aquellos que entran o salen de una región de interés pre-establecida en el contacto célula-célula y en el borde director. Al término de los 2.5 minutos se hizo una relación entre los cometas que permanecen en la zona versus los cometas totales que entraron al área. De esta relación se obtuvo el porcentaje de cometas que permanecen estables y la diferencia correspondió por lo tanto a los cometas que desaparecieron (cometas que entraron en catástrofe):

$$\% \text{ cometas estables} = \frac{\text{cometas que permanecieron en la zona rectangular}}{\text{cometas totales}} \times 100$$

$$100\% - \% \text{ cometas estables} = \% \text{ catástrofes}$$

Los resultados se graficaron para comparar las catástrofes que ocurren en el borde director de células que expresan RacV12 y en morfantes para Gai2 tratadas con 20 nM de NSC23766 versus aquellas que ocurren en el contacto célula-célula en ambas condiciones. Las células que expresan RacV12 muestran un % de catástrofes de 43.9% en el borde director y un 49.6% en el contacto célula-célula, lo que evidencia una disminución significativa en el porcentaje de catástrofes en el contacto célula-célula en comparación a las células controles, similar a lo observado en condiciones morfantes para Gai2 (Fig.10) y las células morfantes para Gai2 tratadas con 20 nM de NSC23766, muestran un % de catástrofes de 52.7% en el borde director y de un 76.1% en el contacto célula-célula. Para evaluar su significancia estadística se aplicó test ANOVA y t-student. **Aumento: 63X**. Barra: 10 μm N = 3 experimentos por condición.

VIII. El inhibidor de Rac1 NSC23766 rescata parcialmente la migración radial de las células de CNC

Rac1 cumple un papel fundamental en la migración celular. De hecho, la extensión de la membrana plasmática para la formación de lamelipodios se realiza predominantemente a través de la polimerización de actina, la cual se encuentra mediada por Rac1 (Ridley y col., 2015). Debido a que Rac1 y RhoA activos se inhiben simultáneamente tanto en el borde director como en el borde posterior, cualquier alteración en las concentraciones de estas GTPasas altera severamente la polaridad celular, y con ello la migración (Moore y col., 2013). Tal como observamos en nuestros resultados, en condiciones morfantes para G α i2, Rac1 aumenta su localización activa tanto en el borde libre como en el borde en contacto con las células, lo que indica cambios significativos en la polaridad celular. Al utilizar un inhibidor farmacológico para alguna de estas proteínas G pequeñas se altera la activación de esta proteína en toda la célula, y tal como se observa en la figura 21, la migración radial de las células de la CNC se rescata parcialmente al agregar una baja concentración de inhibidor de Rac1 (específicamente 20 nM de NSC23766 por 5 minutos). Esto sugiere que los niveles de las proteínas G pequeñas como Rac1 son altamente reguladas en el espacio y en el tiempo, debiendo permanecer activa en el borde director de las células durante la migración e inactiva al cambiar de dirección en la migración, específicamente en el contacto célula-célula posterior a la colisión, donde debería activarse RhoA.

Si incubamos las células con una droga que inhibe a alguna de estas proteínas G pequeñas durante el proceso migratorio estaremos afectando a la célula completa, y no de manera espaciotemporal, por lo cual el efecto de inhibición de Rac1 lo obtendremos tanto en el borde director como en el contacto entre células, provocando una severa disrupción en la migración celular. Esto también se ve reflejado en las células controles tratadas con el inhibidor de Rac1, las cuales pierden completamente su capacidad migratoria al disminuir el área de dispersión entre las células (Fig. 21D).

También es interesante recalcar que un aumento en la tasa de polimerización de los MTs provoca un incremento en la liberación de Rac1 activa, por lo que los resultados de la Figura 21 podrían estar dentro del contexto de que no sería suficiente inhibir Rac1 para rescatar el efecto de los MTs sobre la migración celular. Esto podría sugerir que **si bien el aumento de Rac1 activa aumenta la polimerización de los MTs, este aumento en la tasa de crecimiento de los MTs podría a su vez aumentar también la actividad de Rac1, sugiriendo un mecanismo de retroalimentación positiva**, lo que explicaría el rescate ineficiente de la migración celular en presencia del inhibidor de Rac1.

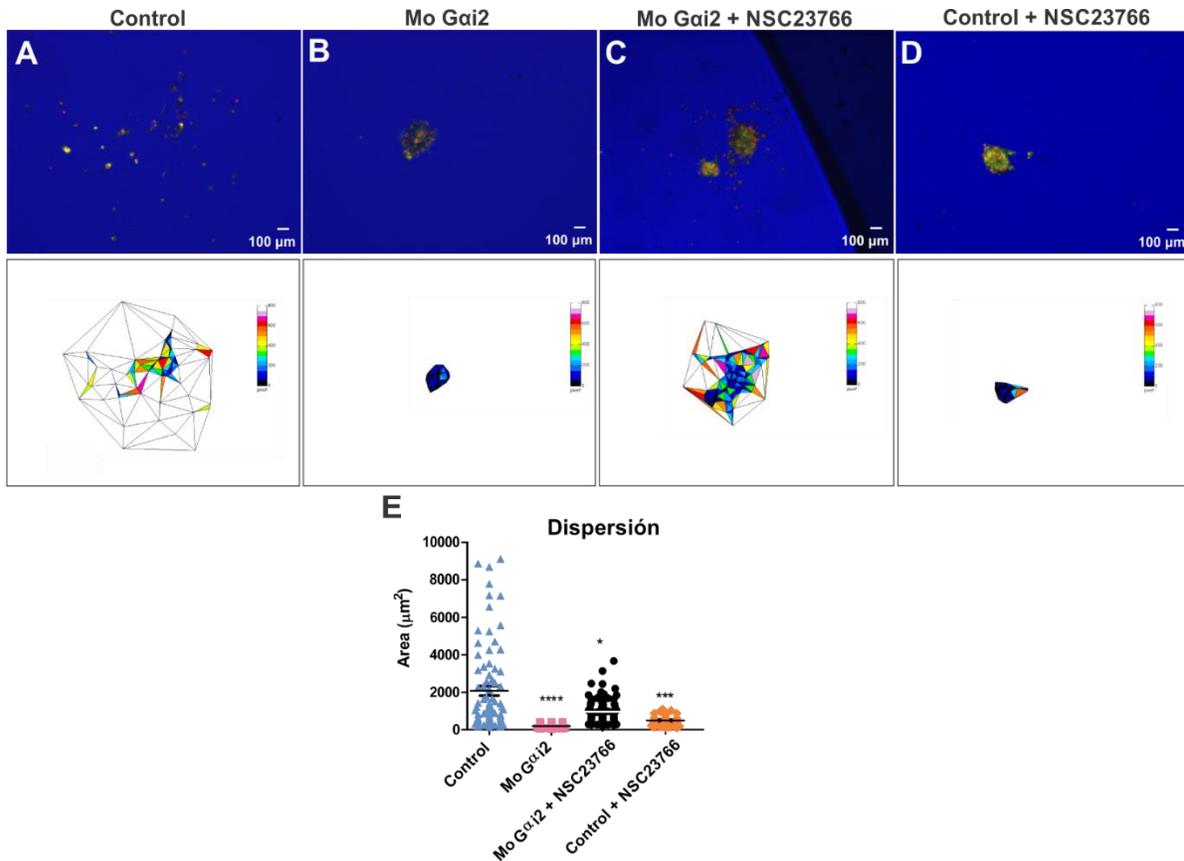


Figura 21. El inhibidor NSC23766 rescata parcialmente el fenotipo morfante de Gai2. (A-D) Explantes de CNC fueron extraídos desde embriones de *Xenopus* en estadio 17, previamente inyectados. Estos se incubaron sobre una placa de plástico con fibronectina y la dispersión de las células de cada condición fue evaluada durante 4 horas a través “time-lapse”. Todos los embriones fueron co-inyectados con H2B-Cherry y GFP de membrana para realizar el seguimiento de las células en forma individual y cuantificación de la dispersión. Se evaluaron cuatro condiciones: Control, Morfolino contra Gai2, Morfolino contra Gai2 + 20 nM NSC23766 y Control + 20 nM de NSC23766. En el cuadrante inferior se muestra la triangulación de Delaunay de un explante representativo de cada condición en el tiempo final (4 horas). (E) El radio entre las áreas promedio correspondientes al tiempo final fueron graficadas a las 4 horas. Se evaluó la significancia con un test de Mann-Whitney para datos no paramétricos (****, $p < 0,0001$). Barras de error: Error estándar. **Aumento 10X.** Barra: 100 µm. Control n total = 15 explantes; MO Gai2 n total = 18 explantes; Mo Gai2 + 20 nM NSC23766 = 14 explantes; Control + 20 nM NSC23766 = 12 explantes; 3 ensayos.

Todos los resultados de esta tesis en su conjunto evidencian **la participación de G α i2 en la migración de la CNC a través del control de la dinámica de los MTs y de la polaridad celular dependiente de Rac1 y RhoA, ambas proteínas requeridas para la polimerización de actina, lo que a su vez controla el desensamblaje de las adhesiones focales y la correcta retracción celular para el avance de la célula en la dirección de la migración.**

Discusión

Para que la migración de la CNC sea efectiva, los MTs deben estar en equilibrio dinámico con el medio circundante. Los MTs son polímeros dinámicos que controlan la migración direccional a través de una serie de procesos coordinados: son las vías para el transporte intracelular de proteínas de larga distancia, las cuales son cruciales para el suministro de nuevos componentes de membrana y moléculas de señalización al borde director de una célula migratoria y también para el reciclaje de los receptores de adhesión celular, como por ejemplo las integrinas.

Los MTs actúan como generadores de fuerza y elementos de compresión para soportar las protuberancias celulares sostenidas en el tiempo, como lamelipodios y filopodios. El ensamblaje y desensamblaje de los MTs está acoplado a la señalización de las GTPasas de la familia Rho, lo que controla la polimerización de actina, la contractilidad impulsada por la miosina y con ello la renovación de las adhesiones célula-matriz y célula-célula. La conversación cruzada entre la actina y la dinámica de los MTs está mediada por una serie de proteínas de unión y reguladores comunes entre ellos. Además, la dinámica de los MTs corticales está físicamente vinculada a las adhesiones focales, lo que facilita la entrega de vesículas secretoras y una comunicación cruzada eficiente.

Como se describió en la sección de la introducción, las subunidades $G\alpha$ de la familia de proteínas G heterotriméricas se han descrito controlando procesos de migración en varios tipos celulares (Cotton y Claing, 2009). Específicamente, la subunidad $G\alpha_i$ se ha reportado controlando la migración en células del sistema inmune (Hwang y col., 2007; Cho y col., 2012; Wiege y col., 2012; Zhong y col., 2012; Hwang y col., 2015).

En esta tesis doctoral, utilizando células de la Cresta Neural Craneal de *Xenopus*, hemos encontrado que la subunidad $G\alpha_{i2}$ de la proteína G heterotrimérica controla la dinámica de los MTs a través de la cual regula los componentes de polaridad celular como las GTPasas Rac y Rho, controlando así la polimerización de actina y

con ello la dinámica de las adhesiones focales, componentes cruciales en la migración celular.

Para esquematizar la función de Gai2 proponemos el siguiente modelo (Figura 22, página 134):

En células migratorias “normales”, Gai2 promueve la organización de los MTs de manera radial (Figura 11C), los cuales son de ensamblaje rápido hacia el borde director (Figura 14C-D) y mantienen una tasa de catástrofes mayor en el borde posterior o contacto célula-célula, en comparación al borde director (Figura 14F). Esta dinámica de los MTs regulada por Gai2 mantiene a su vez la dinámica de desensamblaje de las adhesiones focales (Figura 16G-J y Figura 17), la remodelación del citoesqueleto de actina necesaria para permitir la extensión y retracción del cuerpo celular (Figura 10), para mantener la distribución normal del citoesqueleto de actina y tubulina (Figura 11), la morfología normal de las células durante la migración (Figura 12) y la correcta localización espaciotemporal de las proteínas que regulan la polaridad celular: como Par3, ζ PKC y las GTPasas Rac y Rho (Figura 18 y Figura 19).

En ausencia de Gai2, los MTs se concentran hacia el borde director (Figura 11F), los cuales son de crecimiento lento en comparación a las células controles (Figura 14C-D), son más estables en el tiempo (Figura 13A-F y Figura 14) y mantienen una tasa de catástrofes menor tanto en el borde director como en el borde posterior o contacto célula-célula (Figura 14F). Esto provoca un aumento en el área protruyente (Figura 10C) y una disminución significativa en la retracción celular (Figura 10D), además de un cambio severo en la morfología celular (Figura 12) y una disminución en la dinámica de desensamblaje de las adhesiones focales (Figura 17), las cuales se mantienen más estables en el tiempo y de mayor tamaño (Figura 16). Esto provoca que la localización espaciotemporal de las proteínas de polaridad celular se desregule (Figura 18 y Figura 19), lo que se traduce en una dinámica de MTs aberrante (Figura 14 y 20) y con ello en una migración celular deficiente (Figura 9).

I. Gai2 regula positivamente la dinámica de los MTs para una correcta migración de las CNC

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; Fuentealba y col., 2013), además de que Gai2 se encuentra altamente expresada en células de la CNC en *Xenopus* y en derivados de CNC (Fuentealba y col., 2016).

De hecho, específicamente 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). Incluso algunos autores han reportado que ratones Gai2^{-/-} muestran defectos en la señalización del receptor de quimioquinas de las células B, lo que provoca una quimiotaxis deficiente de estas células y una mala adherencia de ellas a las vénulas endoteliales altas (HEV) de los ganglios linfáticos, defectos que no pueden ser rescatados ni por Gai1 ni por Gai3 (Han y col., 2005). Esto es bastante interesante, ya que revelaría que los diferentes subtipos de Gai podrían desempeñar funciones completamente distintas, a pesar de ser altamente conservadas entre ellas. Por ejemplo, Gai2 y Gai3 se encuentran altamente expresados en el Sistema Inmune, y específicamente en linfocitos T actúan de manera diferente para regular la migración celular. De hecho, la pérdida de función de Gai2 en las células T afecta la migración mediada por la estimulación del receptor de quimioquinas CXCR3 que responde a CXCL9, CXCL10 o CXCL11 (Thompson y col., 2007). Por el contrario, la pérdida de función de Gai3 en las células T aumenta la migración tras la estimulación del receptor de quimioquinas CXCR3, lo que sugiere que esta isoforma de Gai podría ser un regulador negativo de la migración (Thompson y col., 2007).

En este mismo contexto, Ward y Dhanasekaran en el 2012 demostraron un papel crítico para Gai2 en la migración celular estimulada por LPA, mediante la regulación de la fosforilación de p130Cas para inducir metástasis en células de cáncer de

ovario. También en células de cáncer de mama, Gai2 regula la activación de la proteína Rac1 a través de la actividad GEF de Elmo1/Dock180, contribuyendo a la polimerización de actina y a la migración celular (Li y col., 2013).

Debido a que las células de CNC expresan diversos receptores de quimioquinas también expresados en el Sistema Inmune como CXCR4 y C3aR, Gai2 resultó ser un muy buen candidato para regular la migración en este tipo celular.

Para analizar la tasa de migración de las células de CNC en presencia y en condiciones de pérdida de función de Gai2, tal como se mencionó en los resultados, se utilizó un morfolino contra la región 5' UTR de Gai2 el cual se estandarizó para 35 ng como la cantidad necesaria para afectar de forma severa la migración en el modelo de *Xenopus laevis*, sin afectar la inducción de la CNC. De esta manera no sólo se logró bloquear significativamente la migración *in vivo*, sino también se afectó severamente la migración *in vitro*, tal como se observa en la cuantificación de la dispersión celular.

Si bien el estudio de la dispersión radial de las células de la CNC en una placa 2D cubierta con fibronectina es un método barato y fácil de estandarizar, además de considerar la influencia de la matriz extracelular en el proceso migratorio, posee también ciertas limitantes como por ejemplo que no considera algunas señales quimioattractantes del microambiente como por ejemplo la señalización CXCR4/Sdf-1. Esto es interesante, ya que a pesar de la ausencia de señales quimioattractantes, las células controles son capaces de dispersarse de manera radial gracias a la fuerza de inhibición de la locomoción por contacto que experimentan inicialmente, lo que les permite separarse del grupo y migrar. Muy por el contrario, las células morfantas para Gai2 no son capaces de dispersarse eficientemente, manteniéndose en el grupo celular. Este comportamiento celular en ausencia de Gai2 se condice bastante con los resultados obtenidos por Wiege y colaboradores en 2012, donde observaron que macrófagos provenientes de ratones Gai2^{-/-} no son capaces de migrar hacia las zonas de inflamación en casos de alveolitis y peritonitis, ya que éstas pierden su motilidad celular.

Para poder ahondar en el mecanismo de cómo Gai2 estaría regulando la migración, analizamos la morfología celular, y específicamente la dinámica de actina en la condición control versus la condición morfante. Al igual que lo descrito en nuestros resultados, para la condición morfante se encontró que el área protruyente era significativamente mayor en comparación a las células controles, mientras que el área de retracción era mucho menor que en la condición control. De hecho, al analizar la velocidad de retracción se observó una disminución significativa de la velocidad de retracción en las células morfantes, lo que sugiere que las células morfantes para Gai2 poseen protrusiones más estables en el tiempo que las células controles, las cuales se retraen muy poco y tienden a ser de mayor área. Esto sugiere que Gai2 podría estar relacionado a la señalización de proteínas que controlan la formación de protrusiones.

Una de las proteínas G pequeñas encargadas de la remodelación del citoesqueleto de actina es la GTPasa Rac1, la cual se encuentra principalmente activa en el borde director para la formación de lamelipodios durante la migración celular (Nobes y col., 1995; Ridley y col., 2015). Esto nos podría sugerir que en ausencia de Gai2 debería existir más Rac1 activa en el borde director, esto debido al papel de esta proteína G pequeña en la formación de lamelipodios, y sería consistente con nuestros resultados en los que vemos que la pérdida de función de Gai2 se traduce en un aumento del área protruyente. Además, tal como se mencionó anteriormente, en células de cáncer de mama, Gai2 se asocia al receptor CXCR4 para translocar al complejo Elmo1/Dock180 a la membrana celular y activar de esta manera a Rac1 (Li y col., 2013), lo que podría evidenciar una relación molecular entre Gai2 y Rac1. Todos estos antecedentes, sumado a que se ha relacionado la señalización de Gai con la quinasa Src para también activar a Rac1 en células de cáncer de ovario (Ward y col., 2015), podrían tener estrecha relación con el cambio en la morfología celular observado en nuestro estudio.

De forma interesante, cuando analizamos además la distribución de actina y tubulina en la corteza celular, observamos que la actina cortical se pierde en condiciones de pérdida de función de Gai2, a pesar de mostrar protrusiones más

estables en el tiempo, lo que sería contradictorio si pensamos en que deberíamos tener más Rac1 activa, y por lo tanto mayor polimerización de actina a este nivel. Sin embargo, cuando analizamos la distribución de tubulina, observamos que las células morfantes para Gai2 concentran los MTs hacia el borde libre de células, en forma de haces paralelos, a diferencia de las células controles cuya distribución de la tubulina es radial, comenzando desde un centrosoma definido. Esto sugiere que en condiciones de pérdida de función de Gai2 ocurre un aumento en la tasa de polimerización de los MTs hacia el borde director de la célula, lo que podría interferir con la formación de la actina cortical en este mismo espacio. De hecho se sabe que durante la migración celular, los MTs se extienden hasta la periferia donde factores locales provocan cambios en la estabilidad y la dinámica de los MTs, lo que influirá directamente en las vías que regulan la polimerización de la actina (Akhshi y col., 2013), por lo tanto la polimerización de la actina depende de la dinámica de los MTs durante la migración. Esto concuerda bastante con nuestros resultados, donde observamos que al utilizar la droga Nocodazol como droga despolimerizante de los MTs sobre el fenotipo morfante, se obtuvo un rescate parcial de la actina cortical al desensamblarse los MTs que estaban concentrados hacia el borde director. Esto sugiere que en condiciones de disminución de la expresión de Gai2, las células de la CNC experimentarían cambios severos en la dinámica de polimerización y despolimerización de los MTs, provocando que estos ocupen el espacio de la actina cortical, y afectando la polimerización de ésta, lo que puede ser revertido con nocodazol.

Tal como mencionamos anteriormente, los MTs en los últimos años han adoptado un papel fundamental en el proceso de la migración celular, ya que son capaces de regular eventos esenciales para la migración a través de sus funciones en la mecánica celular, el tráfico intracelular y la señalización, todo esto asociado a la dinámica y estabilidad de la red de MTs a lo largo del eje migratorio (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 en comparación a las células controles, observándose un aumento en la polimerización de tubulina hacia el borde director. Se ha descrito que la

despolimerización de la red de MTs o incluso una ligera alteración en la dinámica de los MTs produce una alteración severa en la formación de las protrusiones (Laan y col., 2008), ya que clásicamente se sabe que el crecimiento de los MTs activa localmente a la proteína G pequeña Rac, que a su vez promueve la formación de lamelipodios (Waterman-Storer y col., 1999; Akhshi y col., 2013). Asimismo, otros estudios han demostrado que los MTs 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 del área protruyente en células de CNC morfantes para Gai2, evidenciando una completa falta de “resistencia a la deformación” producto de alteraciones en el citoesqueleto de tubulina, específicamente concentrado hacia el borde director.

Cuando analizamos qué población de MTs se encontraba mayormente concentrada hacia el borde director, observamos un mayor porcentaje de MTs acetilados en las células morfantes para Gai2 en comparación a las células controles, los cuales constituyen MTs más estables según la literatura (Eshun-Wilson y col., 2019). Esto se condice con la disminución severa de la migración en células morfantes para Gai2, ya que algunos autores han demostrado que células de la CNC pueden estimularse para migrar mediante la disminución de la acetilación de los MTs, incluso en matrices blandas (Marchant y col., 2022). Otras investigaciones han sugerido que cambios en la estabilidad de los MTs son necesarios para establecer un citoesqueleto de MTs polarizado en células móviles (Garcin y Straube, 2019). Por ejemplo, el ensamblaje de MTs estimula la señalización de Rac1 en el frente, mientras que la despolimerización estimula la señalización de RhoA a través del intercambio de nucleótidos de guanina asociado a los factores de unión a MTs en la parte trasera (Garcin y Straube, 2019). En este mismo contexto, está ampliamente aceptado que la acetilación de α -tubulina en lisina 40 es una modificación postraducciona que se asocia con los MTs más estables, de larga duración y menos dinámicos (Maruta y col., 1986; Cambray-Deakin y Burgoyne, 1987; Piperno y col., 1987; Houlston y Maro, 1989; Webster y Borisy, 1989; Thyberg y Moskalewski, 1993; Matsuyama y col., 2002; Tran y col., 2007; Matov y col., 2010). Es importante

destacar que se ha demostrado que los MTs acetilados exhiben un enriquecimiento polarizado hacia el borde director durante la migración direccional 3D (Doyle y col., 2009) y en respuesta a heridas en monocapa de células 2D (Yadav y col., 2009). Sin embargo, un trabajo reciente propone que la acetiltransferasa MEC-17 puede promover directamente la acetilación de α -tubulina inhibiendo la motilidad celular al aumentar el área de propagación de las células (Lee y col., 2018), lo cual es consistente con nuestros resultados, donde observamos que células morfantes para Gai2 presentan un fenotipo de inhibición de la migración en presencia de MTs acetilados y altamente concentrados hacia el borde director. Además, en esta tesis encontramos que Gai2 forma un complejo de interacción con α -tubulina y con proteínas de unión a extremo + de los MTs, como EB1 y EB3, estas últimas descritas como proteínas reguladoras de la dinámica de los MTs (Mimori-Kiyosue y col., 2000; Akhmanova y col., 2015; Nehlig y col., 2017; Serre y col., 2019), lo que sugiere fuertemente que Gai2 podría estar regulando también la dinámica de los MTs, siendo parte del complejo de interacción con estas proteínas.

Durante esta tesis, la dinámica de los MTs en presencia y ausencia de Gai2 fue analizada de manera automática a través del software PlusTipTracker de Matlab cuyo algoritmo calcula los “tracks” que pertenecen al mismo MT en crecimiento siguiendo un ángulo de curvatura específico, el cual ciclará entre las fases de polimerización, pausa y catástrofe en sistemas *in vivo* (Applegate y col., 2011). Este software es muy fácil de utilizar y entrega resultados fidedignos, ya que separa las poblaciones de MTs en lentos y rápidos de larga duración y lentos y rápidos de corta duración. La única limitante del método de Applegate y colaboradores es que analiza imágenes que han sido obtenidas desde microscopía TIRF, por lo que en este caso debimos realizar un procesamiento previo de las imágenes que obtuvimos por microscopía confocal para mejorar la apariencia de los cometas de EB3-GFP, procesamiento descrito en la sección Materiales y Métodos de esta tesis. Esta limitante nos llevó a desarrollar un novedoso protocolo para el procesamiento de imágenes provenientes de una fuente diferente, el cual nos entregó resultados detallados acerca del crecimiento y acortamiento de los MTs. De forma interesante, cuando analizamos específicamente la dinámica de los MTs en las células

morfantes para Gai2 siguiendo la señal de la proteína de unión a extremo + de los MTs EB3 fusionada a la proteína GFP, observamos que efectivamente los MTs son más estables en el tiempo, su crecimiento es significativamente más lento en comparación a los MTs de células controles y su tasa de catástrofes es mucho menor.

En este contexto, se ha reportado que las proteínas Gai se encuentran regulando la organización de los MTs astrales durante la división celular asimétrica (Yu y col., 2000; Parmentier y col., 2000; Gotta y Ahringer, 2001; Schaefer y col., 2001; Villaseca y col., 2022), probablemente a través del control de la dinámica de los MTs. Incluso, se ha descrito que los MTs en ausencia de Gai experimentan menos catástrofes *in vitro*, ya que Gai inhibe el ensamblaje de los MTs aumentando su desensamblaje al activar la función GTPasa intrínseca de la tubulina (Roychowdhury y col., 1999). Por lo tanto, Gai podría estar actuando como un GAP (proteína activadora de la actividad GTPasa) para la tubulina, aumentando así la dinámica de los MTs al eliminar el “GTP cap” (Roychowdhury y col., 2008). Estos resultados apoyan nuestro trabajo donde observamos que células morfantes para Gai2 presentan una disminución en la velocidad de crecimiento de los MTs y una disminución significativa de las catástrofes, tanto en el borde director como en el contacto-célula-célula, indicativo de que Gai2 estaría controlando el proceso de migración a través de la regulación de la dinámica de los MTs, posiblemente a través de la interacción con tubulina, funcionando como GAP. Como proyección de esta tesis, sería interesante analizar la tasa de hidrólisis de la tubulina unida a GTP en presencia o ausencia de Gai2 durante la migración de la CNC en *Xenopus*.

II. Gai2 controla la dinámica de las adhesiones focales a través de la regulación de la dinámica de los MTs.

Las células de las CNC, antes de migrar, sufren una transición epitelio mesenquimal (TEM), la cual les permite abandonar su origen y trasladarse a su destino final,

delaminándose del epitelio. Esta migración la realizan a través de la detección de distintas señalizaciones, entre ellas; gradientes químicos (quimiotaxis), gradientes de adhesión (haptotaxis) y de rigidez de la MEC (durotaxis) (Piacentino y col., 2020).

Los componentes físicos de la MEC son detectados a través de los receptores en la membrana plasmática, los cuales forman las adhesiones focales que permiten que la célula se ancle al sustrato y pueda ocurrir la tracción celular (Shacks y col., 2019; Rottner y col., 2019; Dogterom y col., 2019). Estos receptores de la MEC, llamados “integrinas” son estabilizadas gracias a los MTs, ya que estos últimos, orientándose hacia las adhesiones focales (Kaverina y col., 1999), son los encargados del tráfico de estas integrinas, del tráfico de receptores de quimioquinas y de la movilización de otros componentes y proteínas adaptadoras necesarios para regular la dinámica de las adhesiones focales, como por ejemplo Calpaína-2, proteasa encargada del clivaje de las integrinas (Etienne-Manneville y col., 2013; Garcin y col., 2019; Dogterom y col., 2019; Seetharaman y col., 2020).

Se ha reportado que algunas proteínas de unión al extremo + de los MTs, como la proteína EB1, interaccionan con proteínas adaptadoras de las adhesiones focales como talina, la quinasa de adhesión focal (FAK), Paxilina y Src (Bouchet y col., 2016; Dubois y col., 2017). Esto es interesante ya que tal como demostramos en esta tesis, Gai2 interacciona con EB1 (Fig. 13N) y con α 5-integrina (Fig. 16K), lo que mostraría una relación directa entre los MTs, Gai2 y las adhesiones focales. Además, en este trabajo de tesis, observamos que la subunidad Gai2 de la proteína G heterotrimérica regula positivamente la dinámica de los MTs, regulación que por lo tanto, estaría contribuyendo a mantener la dinámica de las adhesiones focales durante la migración. Al disminuir la expresión de la subunidad Gai2, las adhesiones focales se vuelven más estables en el tiempo y poseen un área mayor en comparación a las adhesiones focales de las células controles. Esto nos sugirió que la dinámica de desensamblaje de las adhesiones focales podría encontrarse alterada en las células morfantes para Gai2. Con el fin de responder a esta pregunta, se procedió a realizar ensayos de sincronización de las células con Nocodazol para estudiar el ensamblaje y el desensamblaje de estas adhesiones. Al

comparar las células morfantes para Gai2 con las células controles se observó un cambio drástico en la dinámica de desensamblaje, observándose que las células controles desensamblan rápidamente a los 0.5 minutos de comenzada la sincronización, a diferencia de las células morfantes, que mantienen la misma área de adhesiones focales tanto a los 0.5 minutos que al inicio del tratamiento, lo que muestra una clara disminución en la velocidad de desensamblaje de las adhesiones focales

Algunos autores plantean que el tamaño de las adhesiones focales está regulado por la quinasa de adhesión focal, FAK (Mitra y col., 2005), la cual se activa mediante la fosforilación inducida por Src en el residuo Tyr861 para unirse a componentes asociados al citoesqueleto, como la paxilina y la talina. Esta unión permite que FAK interactúe con la proteína de unión a receptores de factores de crecimiento 2, Grb2, para reclutar a la proteína dinamina, la cual se encarga de la internalización de las integrinas por endocitosis, lo que podría reducir el tamaño de las adhesiones focales (Burrige, 2005; Ezratty y col., 2005, 2009; Wang y col., 2011). Esto es interesante ya que algunos autores han mostrado una relación directa de la subunidad Gai con PI3K y Grb2 en respuesta a factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal, EGF (Cao y col., 2009; Zhang y col., 2015; Li y col., 2016; Liu y col., 2018; Nusková y col., 2021; Villaseca y col., 2022), lo que podría sugerir que en ausencia de Gai, Grb2 no podría reclutar a la proteína dinamina y por lo tanto no habría internalización de las integrinas para la reducción del tamaño de las adhesiones focales. Como proyección de esta tesis sería interesante observar la localización de la dinamina en presencia y ausencia de Gai2, y con ello estudiar el tráfico de las integrinas en condiciones morfantes para Gai2.

Es interesante observar que el desensamblaje de las adhesiones focales de células morfantes para Gai2, comienza recién al minuto de iniciado el tratamiento, mientras que las células controles comienzan un nuevo período de ensamblaje antes del minuto de iniciado el tratamiento, lo que muestra claramente que las células controles poseen una dinámica de desensamblaje mucho más rápida que las

células morfantes. Estos resultados concuerdan con estudios en los que se ha observado que en fibroblastos humanos y células endoteliales, el tratamiento de células migratorias con toxina pertussis (PTX), una droga desacoplante de la subunidad Gai a su receptor, inhibe el desmontaje de la adhesión focal (Sugiura y col., 1996; Orr y col., 2002; Orr y col., 2003). Asimismo, 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), por lo que como proyección de esta tesis sería interesante evaluar la respuesta a trombospondina en ausencia de Gai2.

III. Gai2 controla la dinámica de actina a través de la regulación de la dinámica de los MTs.

En esta tesis doctoral no sólo observamos cambios en la dinámica de los MTs, si no también encontramos cambios severos en la dinámica de actina, en la dinámica de desensamblaje de las adhesiones focales y en la morfología celular en células morfantes para Gai2.

El citoesqueleto de actina y los MTs están estrechamente relacionados con la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, ambos requeridos para la migración celular. El remodelamiento del citoesqueleto de actina y la organización del citoesqueleto de tubulina durante la migración permiten: a) la formación de protrusiones celulares en el frente migratorio, llamado “borde director” de la célula; b) la contractibilidad de actomiosina en las fibras de estrés, retrayendo la parte trasera de la célula, denominada como el “borde posterior” o “borde retráctil”; y c) la dinámica de las adhesiones focales, las cuales se van desensamblando en el borde posterior y reensamblando en el borde director, gracias al transporte celular

mediado por MTs, permitiendo de esta forma el avance del cuerpo celular (Etienne-Manneville, 2013; Wang y col., 2018). Tanto los MTs como los microfilamentos de actina trabajan de forma coordinada para responder a los diversos requerimientos celulares (Etienne-Manneville y col., 2013; Dogterom y col., 2019; Garcin y col., 2019; Seetharaman y col., 2020). Por ejemplo, los MTs participan en el tráfico de proteínas que regulan la polimerización de actina, como EB1 y mDia1-2 las cuales regulan el ensamblaje de los filamentos de actina desde el extremo + de los MTs (Henty-Ridilla y col., 2016). Esto apoya los resultados obtenidos en esta tesis donde observamos que la subunidad Gai2 de la proteína G heterotrimérica no sólo interacciona con α -tubulina, sino también se encuentra formando un complejo de interacción junto con proteínas del extremo + de los MTs como EB1 y EB3, proteínas reguladoras de la dinámica de los MTs y que participan en la polimerización de actina también.

Algunos autores han descrito que a medida que los MTs crecen hacia el borde migratorio, algunas proteínas de unión a extremo + de los MTs, como CLIP170, aumentan la estabilización de los MTs (Galjart y col., 2005) y se asocian estrechamente con mDia1 (formina), desencadenando la polimerización de actina desde el extremo + del MT, contribuyendo a la formación de estructuras como lamelipodios y filopodios (Henty-Ridilla y col., 2016). Estos antecedentes podrían explicar por qué observamos un aumento en la estabilidad de los MTs en el tiempo y un aumento en el área protruyente en las células morfantes para Gai2, lo que sugiere que Gai2 podría estar relacionado directa o indirectamente con CLIP170 o mDia1. Como proyección de esta tesis sería interesante analizar su relación funcional.

Como ya hemos mencionado, en esta tesis observamos que en condiciones de pérdida de función de Gai2 ocurre un cambio drástico en la distribución del citoesqueleto de actina y tubulina, encontrándose esta última más concentrada hacia el borde director de las células morfantes y, en consecuencia, se observa menos actina cortical en esta zona en comparación a las células controles. Esto podría sugerir que tanto los microfilamentos de actina como los MTs tienen una

distribución específica y un espacio “delimitado” dentro de la célula, donde ninguno de los dos componentes del citoesqueleto puede ocupar el espacio del otro. Esta idea surge de la base de algunos estudios recientes que se han hecho para evaluar la relación entre los MTs y microfilamentos de actina *in vitro*, donde se ha observado que, por ejemplo, la reticulación de la actina tiene un impacto fuerte en la movilidad de los MTs (Francis y col., 2019), y los MTs se ven severamente afectados por la presencia de una alta densidad de microfilamentos de actina (Farhadi y col., 2018). También algunos autores han encontrado que el uso de Nocodazol como droga despolimerizante de los MTs aumenta la formación de fibras de estrés en las células (Bershadsky y col., 1996), lo que se condice bastante con nuestros resultados, donde observamos que en presencia de Nocodazol, en las células morfantes para Gai2 se rescata la actina cortical, probablemente a través de la correcta localización de RhoA activa, lo cual discutiremos a continuación.

IV. Gai2 regula la polaridad celular durante la migración a través del control de la dinámica de los MTs.

La migración celular es un proceso polarizado en el cual un borde anterior protrusivo 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). Los MTs han sido descritos regulando todos los procesos esenciales para la migración celular, y sobre todo regulando el tráfico de proteínas para el establecimiento de una polaridad antero-posterior que le otorgue a la célula la capacidad de migrar (Etienne-Manneville y col., 2013).

Se ha descrito que la despolimerización de la red de MTs o incluso una ligera alteración en la dinámica de éstos, produce una alteración severa en la formación de las protrusiones (Laan y col., 2008). Esto es interesante, ya que los MTs no sólo comparten proteínas adaptadoras con el citoesqueleto de actina como describimos anteriormente, si no también se ha propuesto que la polimerización de los MTs

promueve la activación de Rac1 localmente (Best y col., 1996; Waterman-Storer y col., 1999; Moore y col., 2013), mientras que la despolimerización de los MTs activa a RhoA (Bershadsky y col., 1996; Enomoto, 1996; Moore y col., 2013). Esto ayudaría a establecer la polaridad antero-posterior de las células con el fin de mantener la direccionalidad de la migración, y resalta aún más la importancia de controlar la dinámica de los MTs en la migración celular direccionada.

Estos antecedentes se condicen bastante con los resultados obtenidos en esta tesis, donde observamos que en condiciones de pérdida de función de Gai2 disminuye las catástrofes de los MTs y promueve la estabilización de la tubulina y con ello un aumento en la localización de Rac1 activo en el borde director y en el contacto célula-célula, lo que se contrapone completamente al fenotipo normal de migración de la CNC donde observamos que, al ocurrir CIL, Rac1 se “apaga” en el contacto célula-célula, cambiando su polaridad hacia el borde libre de células, y de esa forma continuar con una migración direccionada.

Algo completamente diferente pasa con RhoA activo, el cual “se enciende” en el contacto célula-célula en la condición control, mientras que en las células morfantes para Gai2 desaparece del contacto célula-célula y cambia su localización hacia el borde director. Nuestros resultados muestran que la vía ROCK, a través de la fosforilación de la cadena liviana de la Miosina se mantiene activa en las células morfantes para Gai2 en todo el contorno celular del borde director, a diferencia de las células controles que mantiene activa la vía ROCK en el cuerpo celular, más cerca del contacto célula-célula. Esto sugiere fuertemente que la fuerza de tracción celular estaría orientada hacia el borde director y no hacia el cuerpo celular, lo que impediría una correcta contracción para promover la migración celular. Recordemos que la Miosina genera las fuerzas de contracción que se transmiten a través de las adhesiones focales para generar la tracción sobre la MEC, por lo tanto, sería interesante estudiar cómo Gai2 se relaciona con la Miosina para regular la contracción celular. Además, en los últimos años se ha visto que los cambios en la dureza del sustrato van provocando cambios en los niveles de acetilación de los MTs de las células de CNC para adaptarse a estos cambios en la rigidez (Marchant

y col., 2021). Este antecedente, sumado a nuestros resultados donde observamos mayor acetilación en los MTs de células morfantes para Gai2, hacen interesante la posibilidad de estudiar a Gai2 en el contexto de la durotaxis, como proyección de esta tesis.

De forma interesante, cuando las células morfantes para Gai2 se trataron con un inhibidor farmacológico de Rac1 (NSC23766) fue posible rescatar la dinámica de los MTs y la tasa de catástrofes. Asimismo, cuando se inyectó una mutante de Rac1 constitutivamente activa, se observó un fenotipo similar al fenotipo morfante para Gai2, es decir, un aumento en la estabilidad de los MTs y una disminución en la dinámica y la tasa de catástrofes. Sin embargo, cuando se observó el comportamiento migratorio de las células morfantes para Gai2 tratadas con el inhibidor de Rac1, se observó sólo un rescate parcial de la migración. Este rescate parcial del comportamiento migratorio, podría deberse a la forma en que se realiza el tratamiento con el inhibidor. En este caso, debido a que se adiciona el inhibidor en el medio de cultivo, toda la célula queda expuesta a éste, por lo tanto, es muy probable que se esté inhibiendo a Rac1 en el borde director también, donde justamente es necesario para promover la migración direccionada. Esto sugiere que tanto la regulación espacio-temporal como también las concentraciones precisas de Rac1 son factores cruciales para la migración direccionada de la CNC. Como proyección, sería interesante poder inhibir a Rac1 sólo en el contacto célula-célula en la condición morfante a través de alguna herramienta optogenética, lo que creemos podría mejorar drásticamente el rescate del fenotipo de migración observado en las células morfantes para Gai2.

Otras proteínas que regulan la polaridad celular y que fueron estudiadas en esta tesis son ζ PKC y Par-3, las cuales valga la redundancia, le otorgan la polaridad ápico/basal a células diferenciadas y células embrionarias de origen epitelial. De hecho, algunos estudios han mostrado que en células epiteliales, Par3 y ζ PKC se asocian con complejos de adhesión célula-célula y parecen ser muy importantes para establecer la polaridad ápico-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

MTs 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 (CIL) en las células de CNC en *Xenopus*, promoviendo la catástrofe de los MTs en el contacto celular (durante la colisión), a través de la inhibición de la señalización de Rac1/Trio (Moore y col., 2013). Estos antecedentes apoyan nuestros resultados, cuando observamos que la localización subcelular de las proteínas de polaridad Par3 y ζ PKC, en las células morfantes para Gai2, cambia en comparación a las células controles, lo que podría estar estrechamente relacionado con la dinámica deficiente de los MTs, lo que retrasa la entrega de estas proteínas a los sitios requeridos. Además, en esta tesis encontramos que Gai2 se encuentra interaccionando con ζ PKC, revelando así una estrecha relación entre esta subunidad de la proteína G y la polaridad celular.

Conclusiones

Los MTs son importantes en la determinación, mantenimiento y cambios en la polaridad celular. La inestabilidad dinámica permite que la matriz de MTs responda a las señales de forma rápida y eficaz. Si este proceso es lento durante la migración celular colectiva, la respuesta frente a señales externas será lenta también, lo que podría afectar la motilidad celular ya que las células no podrían responder de manera eficiente.

En nuestro modelo, Gai2 juega un papel importante en la dinámica de los MTs y la polaridad celular. La disminución de Gai2 no permitiría el cambio eficiente de la dirección en la que debe extenderse la nueva protrusión, porque la protrusión primaria es más estable en el tiempo y tiene más Rac1 activa que en las células controles, lo que además podría sugerir una contractilidad deficiente de las células, ya que observamos un cambio en la localización de RhoA que debería estar en el contacto célula-célula y que en condiciones morfantes de Gai2 se localiza hacia el borde director, además de una reducción en el área y la velocidad de retracción de las protrusiones, acompañado de un cambio en la localización de pMLC, ahora localizado en borde director y un aumento en la adhesión célula-matriz. Como tal, es interesante notar que la despolimerización de MTs por el tratamiento con nocodazol, y la inhibición de Rac1 por el tratamiento con NSC73266, estarían presumiblemente afectando a toda la célula, y aún en estas condiciones, estas moléculas son capaces de rescatar el efecto de la inhibición de la expresión de Gai2, un efecto similar al que Moore y sus colegas describieron con Par3, que regula la catástrofe de MTs durante CIL (Moore y col., 2013). Todos estos hallazgos establecen que, el equilibrio entre la dinámica de los MTs y los niveles de Rac1/RhoA GTP son cruciales para establecer una polaridad adecuada durante la migración celular. **Todos estos antecedentes sitúan a Gai2 como un regulador maestro de la polaridad, morfología y dinámica de la adhesión célula-matriz, a través del control de la dinámica de los MTs, y con ello, de la conversación**

cruzada entre los citoesqueletos de actina y tubulina, permitiendo de esta forma la correcta migración colectiva de las células de la CNC (Fig. 22 y 23).

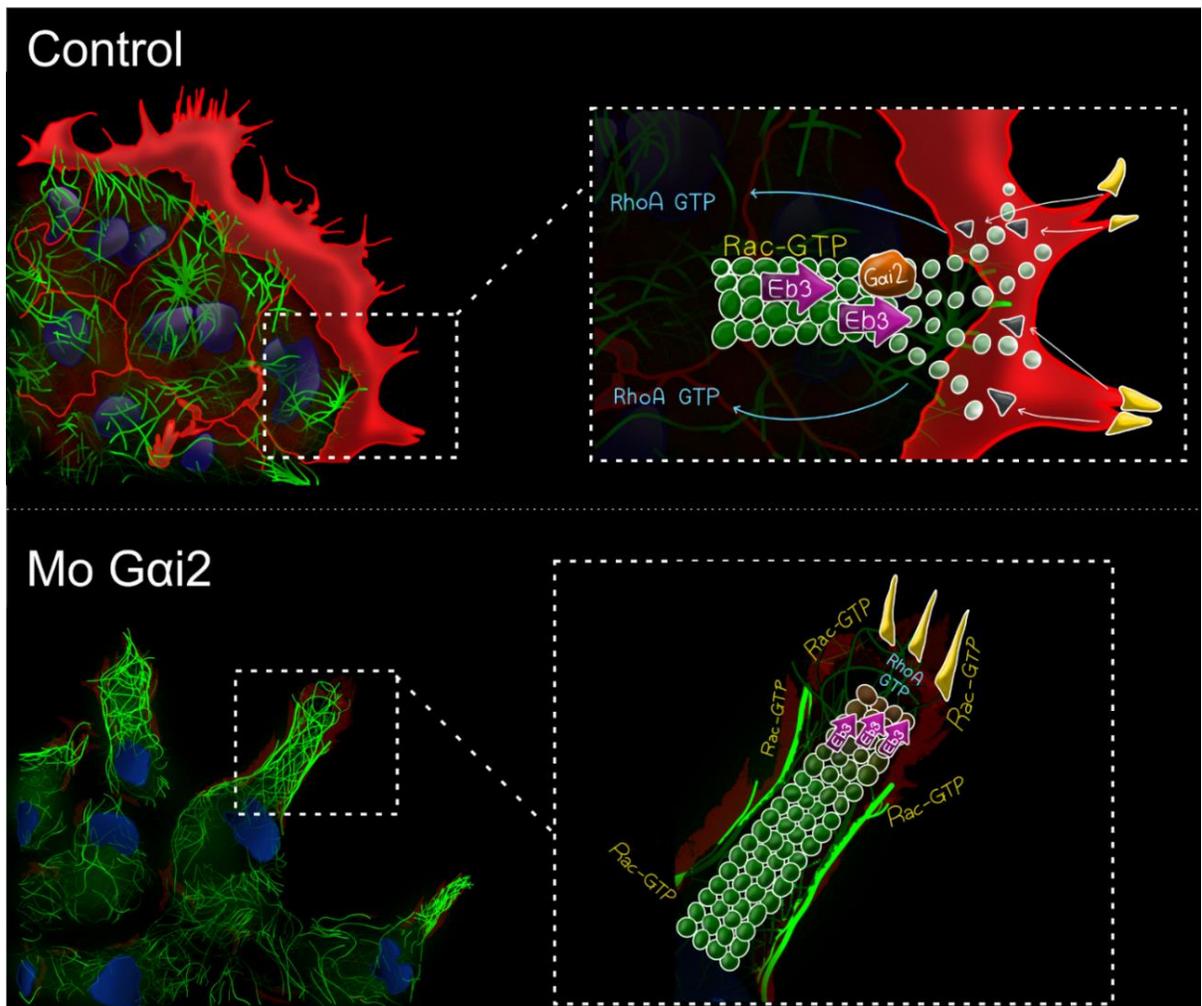


Figura 22. Modelo Molecular En la condición Control, las células que expresan Gai2 mantienen la red de MTs más dinámica (panel superior, círculos verde claro) a través de la unión de Gai2 a la tubulina y a las proteínas EB, lo que permite la formación de la actina cortical en las células líderes (zona roja), favoreciendo el desensamble rápido de las adhesiones focales (puntas amarillas y grises) y con ello el cambio en la dirección de la migración durante CIL, comandado por RhoA en el borde posterior y Rac1 en el borde director. Muy por el contrario en ausencia de Gai2 (Mo Gai2), las células disminuyen la dinámica de los MTs, disminuyendo la tasa de catástrofes, las adhesiones focales se mantienen estables y de mayor tamaño, como se observa en el panel inferior como puntas amarillas, los MTs se vuelven más estables y más lentos en el tiempo (círculos verde oscuro), y por lo tanto las protrusiones son más estables también, lo que disminuye la tasa de desensamblaje de las adhesiones focales y estorba en el espacio donde debería formarse la actina cortical (la zona roja se forma débilmente). Al aumentar la estabilización de la tubulina aumenta la activación de Rac1 en el borde director, actividad que se mantiene en el contacto célula-célula durante CIL, lo que finalmente, impide la migración colectiva.

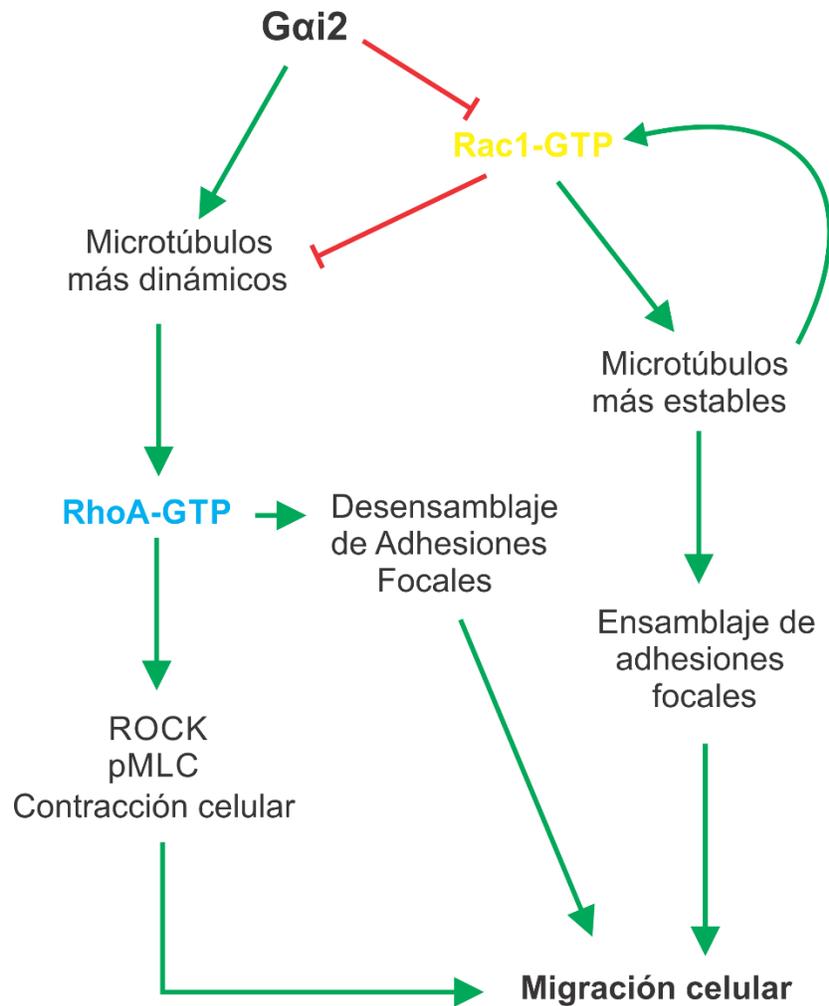


Figura 23. Modelo Celular Gai2 mantiene los MTs dinámicos para permitir el movimiento celular, mientras que inhibe a Rac1 activa (en amarillo) de manera de evitar que los MTs se estabilicen y con ello aumente el ensamblaje de las adhesiones focales. Esto favorece la contracción celular y el desensamblaje de las adhesiones focales mediada por RhoA activa (en celeste), permitiendo que la célula “se despegue” de la matriz extracelular y ocurra entonces la migración.

Referencias

- Abercrombie M., Heaysman J. E., Pegrum S. M. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture: IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp. Cell Res.* 67, 359–367. 10.1016/0014-4827(71)90420-4
- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 16, no. 12, pp. 711-726.
- Alexandrova, A. Y., Arnold K., Schaub S., Vasiliev J. M., Meister 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, e3234.
- Alfandari, D., Cousin, H., Gaultier, A., Smith, K., White, J. M., Darribère, T. and DeSimone, D. W. (2001). Xenopus ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. *Current Biology* 11, 918-930.
- Alfandari D., Taneyhill L.A. (2018) Cut loose and run: The complex role of ADAM proteases during neural crest cell development. *Genesis*. 56(6-7):e23095. doi: 10.1002/dvg.23095. Epub 2018 Feb 24. PMID: 29476604; PMCID: PMC6105527.
- Alieva, I. B., Zemskov, E. A., Kireev, I. I., Gorshkov, B. A., Wiseman, D. A., Black, S. M. and Verin, A. D. (2010). Microtubules growth rate alteration in human endothelial cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010.
- Altschuler, S. J., Angenent, S. B., Wang, Y. and Wu, L. F. (2008). On the spontaneous emergence of cell polarity. *Nature* 454, 886-889.
- Amano M., Chihara K., Kimura K., Fukata Y., Nakamura N., Matsuura Y., Kaibuchi K. (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 275, 1308-1311
- Applegate, K. T., Besson, S., Matov, A., Bagonis, M. H., Jaqaman, K. and Danuser, G. (2011). PlusTipTracker: Quantitative image analysis software for the measurement of microtubule dynamics. *Journal of Structural Biology* 176, 168-184.
- Arai H., Tsou C. L., Charo I. F. (1997). Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: Evidence that directed migration is mediated by betagamma dimers released by activation of galphai-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14495–14499. 10.1073/pnas.94.26.14495
- Aybar, M. J., Nieto, M. A. and Mayor, R. (2003). Snail precedes Slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the Xenopus neural crest. *Development* 130, 483-494

- Baas, P. W. and Ahmad, F. J. (1992). The plus ends of stable microtubules are the exclusive nucleating structures for microtubules in the axon. *Journal of Cell Biology* 116, 1231-1241.
- Barriga, E., Franze K., Charras G., Mayor R. (2018). Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration in vivo. *Nature*. 22;554(7693):523-527. doi: 10.1038/nature25742.
- Belmadani, A., Tran, P. B., Ren, D., Assimacopoulos, S., Grove, E. A. and Miller, R. J. (2005). The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors. *Journal of Neuroscience* 25, 3995-4003.
- Best, A., Ahmed, S., Kozma, R. & Lim, L. (1996). The Ras-related GTPase Rac1 binds tubulin. *J. Biol. Chem* 271, 3756 –3762.
- Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E. L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D. and Surrey, T. (2007). Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* 450, 1100-1105
- Bilozur, M. E. and Hay, E. D. (1988). Neural crest migration in 3D extracellular matrix utilizes laminin, fibronectin, or collagen. *Developmental Biology* 125, 19-33
- 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.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*, 94(1), 235–263. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>
- Blumer J. B., Smrcka A. V., Lanier S. M. (2006). Mechanistic pathways and biological roles for receptor-independent activators of G-protein signaling. *Pharmacol. Ther.* 113, 488–506. 10.1016/j.pharmthera.2006.11.001
- Bornens, M., Paintrand, M., Berges, J., Marty, M. C. and Karsenti, E. (1987). Structural and chemical characterization of isolated centrosomes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 8, 238-249.
- Böttcher, R. T., Veelders, M., Rombaut, P., Faix, J., Theodosiou, M., Stradal, T. E., Rottner, K., Zent, R., Herzog, F. & Fässler, R. (2017) Kindlin-2 recruits paxillin and Arp2/3 to promote membrane protrusions during initial cell spreading. *J. Cell Biol.* 216, 3785-3798.
- Brangwynne, C. P., MacKintosh, F. C. and Weitz, D. A. (2007). Force fluctuations and polymerization dynamics of intracellular microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 16128-16133.
- Burridge, K. & Guillyuy, C. (2016) Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp. Cell Res.* 343, 14–20.

Burstyn-Cohen, T., Stanleigh, J., Sela-Donenfeld, D. and Kalcheim, C. (2004). Canonical Wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking BMP/noggin signaling with G1/S transition. *Development* 131, 5327-5339.

Cambray-Deakin, M.A., and Burgoyne R.D. (1987). Acetylated and detyrosinated alpha-tubulins are co-localized in stable microtubules in rat meningeal fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 8:284–291 10.1002/cm.970080309

Carlier, M. F. and Pantaloni, D. (1982). Assembly of microtubule protein: Role of guanosine di- and triphosphate nucleotides. *Biochemistry* 21, 1215-1224.

Carmona-Fontaine, C., Acuña, G., Ellwanger, K., Niehrs, C. and Mayor, R. (2007). Neural crests are actively precluded from the anterior neural fold by a novel inhibitory mechanism dependent on Dickkopf1 secreted by the prechordal mesoderm. *Developmental Biology* 309, 208-221.

Carmona-Fontaine, C., Matthews, H. K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G. A., Parsons, M., Stern, C. D. and 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., Tada, M., Woods, M., Page, K. M., Parsons, M., Lambris, J. D. and Mayor, R. (2011). Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. *Developmental Cell* 21, 1026-1037.

Chao, W. T. & Kunz, J. (2009) Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *FEBS Lett.* 583, 1337-1343.

Chao, W. T., Ashcroft, F., Daquinag, A. C., Vadakkan, T., Wei, Z., Zhang, P., Dickinson, M. E. & Kunz J. (2010) Type I phosphatidylinositol phosphate kinase beta regulates focal adhesion disassembly by promoting beta1 integrin endocytosis. *Mol. Cell Biol.* 30, 4463-4479.

Chen, X. and Macara, I. G. (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nature Cell Biology* 7, 262-269.

Cheung, M. and Briscoe, J. (2003). Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development* 130, 5681-5693.

Chetrit, D., Ziv, N. & Ehrlich, M. (2009) Dab2 regulates clathrin assembly and cell spreading. *Biochem. J.* 418, 701-715.

Cheung, M., Chaboissier, M. C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A. and Briscoe, J. (2005). The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Developmental Cell* 8, 179-192.

Choi, C. K., Vicente-Manzanares M., Zareno J., Whitmore L. A., Mogilner A. & Horwitz A. R. (2008) Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature Cell Biol.* 10, 1039–1050.

Cismowski M. J., Takesono A., Bernard M. L., Duzic E., Lanier S. M. (2001). Receptor-independent activators of heterotrimeric G-proteins. *Life Sci.* 68, 2301–2308. 10.1016/s0024-3205(01)01019-0

Cleary, R. A., Wang, R., Waqar, O., Singer, H. A. & Tang, D. D. (2014) Role of c-Abl tyrosine kinase in smooth muscle cell migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 306, C753–761.

Close, B., Banister, K., Baumans V., Bernoth, E.M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton D. and Warwick, C. (1996). Recommendations for the Euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals.* 30. 293-316.

Colombelli, J., Besser, A., Kress, H., Reynaud, E. G., Girard, P., Caussinus, E., Haselmann, U., Small, J. V., Schwarz, U. S. & Stelzer, E. H. (2009) Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization, *J.Cell.Sci.* 122, 1665–1679.

Colombo K., Grill S. W., Kimple R. J., Willard F. S., Siderovski D. P., Gonczy P. (2003). Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Caenorhabditis elegans embryos.* *Science* 300, 1957–1961. 10.1126/science.1084146

Conde C, Cáceres A. (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci.* 10(5):319-32. doi: 10.1038/nrn2631.

Cornell, R. A. and Eisen, J. S. (2000). Delta signaling mediates segregation of neural crest and spinal sensory neurons from zebrafish lateral neural plate. *Development* 127, 2873-2882

Crowley, E. & Horwitz, A. F. (1995) Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal tension regulate the release of fibroblast adhesions. *J. Cell Biol.* 131, 525–537.

Dammermann, A. and Merdes, A. (2002). Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *Journal of Cell Biology* 159, 255-266.

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

planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* 7, 1083–1090. 10.1038/ncb1319

Delaune, E., Lemaire, P. and Kodjabachian, L. (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* 132, 299-310.

Denker S. P., McCaffery J. M., Palade G. E., Insel P. A., Farquhar M. G. (1996). Differential distribution of alpha subunits and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. *J. Cell Biol.* 133, 1027–1040. 10.1083/jcb.133.5.1027

di Pietro F., Echard A., Morin X. (2016). Regulation of mitotic spindle orientation: An integrated view. *EMBO Rep.* 17, 1106–1130. 10.15252/embr.201642292

Dogterom, M., Kerssemakers, J. W. J., Romet-Lemonne, G. and Janson, M. E. (2005). Force generation by dynamic microtubules. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 67-74.

Dogterom M. and Koenderink, G. H. (2019). "Actin–microtubule crosstalk in cell biology," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 20, no. 1, pp. 38-54.

Doyle, A.D., Wang F.W., Matsumoto K., and Yamada K.M.. 2009. One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *J. Cell Biol.* 184:481–490 10.1083/jcb.200810041

Dragestein, K. A., Van Cappellen, W. A., Van Haren, J., Tsihidis, G. D., Akhmanova, A., Knoch, T. A., Grosveld, F. and Galjart, N. (2008). Dynamic behavior of GFP-CLIP-170 reveals fast protein turnover on microtubule plus ends. *Journal of Cell Biology* 180, 729-737.

Du Q., Macara I. G. (2004). Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* 119, 503–516. 10.1016/j.cell.2004.10.028

Dujardin, D. L. and Vallee, R. B. (2002). Dynein at the cortex. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 44-49.

Efimov, A., Schiefermeier, N., Grigoriev, I., Brown, M. C., Turner, C. E., Small, J. V. and Kaverina, I. (2008). Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites. *Journal of Cell Science* 121, 196-204.

Endo, Y., Osumi, N. and Wakamatsu, Y. (2002). Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development. *Development* 129, 863-873.

Enomoto, T. (1996). Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: Possible involvement of the Rho signal cascade. *Cell Structure and Function* 21, 317-326.

Epperlein, H. H., Halfter, W. and Tucker, R. P. (1988). The distribution of fibronectin and tenascin along migratory pathways of the neural crest in the trunk of amphibian embryos. *Development* 103, 743-756.

Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A. D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C. (2005). A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7853-7858.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.

Etienne-Manneville S. (2013) Microtubules in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 471–499.

Ezratty, E. J., Partridge, M. A. & Gundersen, G. G. (2005) Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase *Nat. Cell Biol.* 7, 581-590.

Ezratty, E. J., Bertaux, C., Marcantonio, E. E. & Gundersen, G. G. (2009) Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J. Cell Biol.* 187, 733-747.

Faix, J., Breitsprecher, D., Stradal, T. E. B., & Rottner, K. (2009). Filopodia: Complex models for simple rods. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(8–9), 1656–1664. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.02.012>

Feigin M. E., Muthuswamy S. K. (2009). Polarity proteins regulate mammalian cell-cell junctions and cancer pathogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 694–700. 10.1016/j.ceb.2009.07.003

Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R. & Huttenlocher, A. (2004) Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nature Cell Biol.* 6, 977–983.

Franco, S. J. & Huttenlocher, A. (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell Sci.* 118, 3829–3838.

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

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 JI, Hinrichs MV, Olate J, Caprile T, Torrejón M. (2016). Expression profiles of the Gα subunits during *Xenopus tropicalis* embryonic development. *Gene Expr Patterns*; 22(1):15-25. doi: 10.1016/j.gep.2016.09.001.
- Fukata, Y., Oshiro, N., Shinohara, A. (2003). Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *Journal of Neurochemistry* 87, 780-790.
- Galjart, N. (2010). Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Current Biology* 20, R528-R537.
- Garcia-Castro, M. I., Marcelle, C. and Bronner-Fraser, M. (2002). Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* 297, 848-851.
- Gao, L., Macara, I. G. and Joberty, G. (2002). Multiple splice variants of Par3 and of a novel related gene, Par3L, produce proteins with different binding properties. *Gene* 294, 99-107
- Gerthoffer, W. T. (2008) Migration of airway smooth muscle cells. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 5, 97–105.
- Gimona, M., Djinic-Carugo, K., Kranewitter, W. J. and Winder, S. J. (2002). Functional plasticity of CH domains. *FEBS Letters* 513, 98-106.
- Glavic, A., Silva, F., Aybar, M. J., Bastidas, F. and Mayor, R. (2004). Interplay between Notch signaling and the homeoprotein Xiro1 is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos. *Development* 131, 347-359.
- Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26:3122–3142.
- Goldstein, B. and Macara, I. G. (2007). The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization. *Developmental Cell* 13, 609-622.
- Gotta M., Dong Y., Peterson Y. K., Lanier S. M., Ahringer J. (2003). Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr. Biol.* 13, 1029–1037. 10.1016/s0960-9822(03)00371-3
- Grill S. W., Gönczy P., Stelzer E. H., Hyman A. A. (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* 409, 630–633. 10.1038/35054572
- Gundersen, G. G. (2002). Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 296-304.
- Gundersen, G. G. and Bretscher, A. (2003). Microtubule asymmetry. *Science* 300, 2040-2041.

Hammond, J. W., Cai D., Verhey K. J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol.* (1):71-6. doi: 10.1016/j.ceb.2007.11.010.

Hammond, J. W., Huang, C. F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G. and Verhey, K. J. (2010). Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Molecular Biology of the Cell* 21, 572-583.

Han S. B., Moratz C., Huang N. N., Kelsall B., Cho H., Shi C. S. (2005). Rgs1 and Gnai2 regulate the entrance of B lymphocytes into lymph nodes and B cell motility within lymph node follicles. *Immunity* 22, 343–354. 10.1016/j.immuni.2005.01.017

Henning Stumpf, B., Ambriović-Ristov, A., Radenovic, A., and Smith, A.-S. (2020). Recent Advances and Prospects in the Research of Nascent Adhesions. *Front. Physiol.* 11, 574371. doi:10.3389/fphys.2020.574371

Hepler J. R., Gilman A. G. (1992). G proteins. *Trends biochem. Sci.* 17, 383–387. 10.1016/0968-0004(92)90005

Honnappa, S., John, C. M., Kostrewa, D., Winkler, F. K. and Steinmetz, M. O. (2005). Structural insights into the EB1-APC interaction. *EMBO Journal* 24, 261-269.

Honore, S. M., Aybar, M. J. and Mayor, R. (2003). Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos. *Developmental Biology* 260, 79-96.

Houliston, E., and Maro B. (1989). Posttranslational modification of distinct microtubule subpopulations during cell polarization and differentiation in the mouse preimplantation embryo. *J. Cell Biol.* 108:543–551 10.1083/jcb.108.2.543

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.

Iniguez-Lluhi, J. A., Simon M. I., Robinshaw JD, Gilman A. G. (1992) G protein beta gamma subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of gamma. *J Biol Chem.* 267:23409–23417.

Inoue, S. and Salmon, E. D. (1995). Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Molecular Biology of the Cell* 6, 1619-1640.

Ivaska, J. (2012). Unanchoring integrins in focal adhesions. *Nat Cell Biol* 14, 981–983. <https://doi.org/10.1038/ncb2592>

Janson, M. E. and Dogterom, M. (2004). A bending mode analysis for growing microtubules: evidence for a velocity-dependent rigidity. *Biophysical journal* 87, 2723-2736

Jaworski, J., Kapitein, L. C., Gouveia, S. M., Dortland, B. R., Wulf, P. S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S. A., Di Stefano, P., Demmers, J. (2009). Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron* 61, 85-100.

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. *Journal of Cell Science* 124, 2642-2653

Kardash, E., Reichman-Fried, M., Maître, J. L., Boldajipour, B., Papusheva, E., Messerschmidt, E. M., Heisenberg, C. P. and Raz, E. (2010). A role for Rho GTPases and cell cell adhesion in single-cell motility in vivo. *Nature Cell Biology* 12, 47-53; sup pp 1-5311.

Kaverina, I., Rottner, K. and Small, J. V. (1998). Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *Journal of Cell Biology* 142, 181-190.

Kaverina, I., Krylyshkina, O. and Small, J. V. (1999). Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *Journal of Cell Biology* 146, 1033-1043.

Kaverina, I., Krylyshkina, O., Gimona, M., Beningo, K., Wang, Y. L. and Small, J. V. (2000). Enforced polarisation and locomotion of fibroblasts lacking microtubules. *Current Biology* 10, 739-742.

Kaverina, I., Krylyshkina, O., Beningo, K., Anderson, K., Wang, Y. L. and Small, J. V. (2002). Tensile stress stimulates microtubule outgrowth in living cells. *Journal of Cell Science* 115, 2283-2291.

Kay, R. R., Langridge, P., Traynor, D. and Hoeller, O. (2008). Changing directions in the study of chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 455-463.

Khawaja, S., Gundersen, G. G. and Bulinski, J. C. (1988). Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *Journal of Cell Biology* 106, 141-149.

Kirschner, M. and Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell* 45, 329-342.

Kiyomitsu T. (2019) The cortical force-generating machinery: How cortical spindle pulling forces are generated. *Curr. Opin. Cell Biol.* 60, 1–8. 10.1016/j.ceb.2019.03.001

Komarova, Y. A., Vorobjev, I. A. and Borisy, G. G. (2002). Life cycle of MTs: Persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary. *Journal of Cell Science* 115, 3527-3539.

Komarova, Y., Lansbergen, G., Galjart, N., Grosveld, F., Borisy, G. G. and Akhmanova, A. (2005). EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Molecular Biology of the Cell* 16, 5334-5345.

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L. (1995). The ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 15, 1942-1952.

Krylyshkina, O., Kaverina, I., Kranewitter, W., Steffen, W., Alonso, M. C., Cross, R. A. and Small, J. V. (2002). Modulation of substrate adhesion dynamics via microtubule targeting requires kinesin-1. *Journal of Cell Biology* 156, 349-359.

Kuo, J. C., Han, X., Hsiao, C. T., Yates, J. R. & Waterman C. M. (2011) Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for beta-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat. Cell Biol.* 13, 383-393.

Kurachi, M., Hoshi, M. and Tashiro, H. (1995). Buckling of a single microtubule by optical trapping forces: Direct measurement of microtubule rigidity. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 30, 221-228.

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

Kurokawa, K., Nakamura, T., Aoki, K., Matsuda, M. (2005) Mechanism and role of localized activation of Rho family GTPases in growth factor-stimulated fibroblasts and neuronal cells. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 631–634.

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

LaBonne, C. and Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest induction in *Xenopus*: Evidence for a two-signal model. *Development* 125, 2403-2414.

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

Lansbergen, G. and Akhmanova, A. (2006). Microtubule plus end: A hub of cellular activities. *Traffic* 7, 499-507.

Lee S. P., Serezani C. H., Medeiros A. I., Ballinger M. N., Peters-Golden M. (2009). Crosstalk between prostaglandin E2 and leukotriene B4 regulates phagocytosis in alveolar macrophages via combinatorial effects on cyclic AMP. *J. Immunol.* 182, 530–537. 10.4049/jimmunol.182.1.530

Liao, G., Nagasaki, T. and Gundersen, G. G. (1995). Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: Implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *Journal of Cell Science* 108, 3473-3483.

Li H., Yang L., Fu H., Yan J., Wnag Y., Guo H. (2013). Association between Gai2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis. *Nat. Commun.* 4, 1706. [10.1038/ncomms2680](https://doi.org/10.1038/ncomms2680)

Lin H. C., Duncan J. A., Kozasa T., Gilman A. G. (1998). Sequestration of the G protein beta gamma subunit complex inhibits receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5057–5060. [10.1073/pnas.95.9.5057](https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5057)

Linker, C. and Stern, C. D. (2004). Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* 131, 5671-5681.

MacHacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G. L., Hahn, K. M. and Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99-103.

Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E., & Pollard, T. D. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3739–3744. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3739>

Maier, O., Ehmsen E., Westermann P. (1995). Trimeric G protein alpha subunits of the Gs and Gi families localized at the Golgi membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 135–143. [10.1006/bbrc.1995.1315](https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1315)

Malbon, C. C. (2005). G proteins in development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 689–701. [10.1038/nrm1716](https://doi.org/10.1038/nrm1716)

Mallavarapu, A., Mitchison T. (1999). Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J. Cell Biol.* 146:1097–106

Mancilla, A. and Mayor, R. (1996). Neural crest formation in *Xenopus laevis*: Mechanisms of Xslug induction. *Developmental Biology* 177, 580-589.

Marchant, L., Linker, C., Ruiz, P., Guerrero, N. and Mayor, R. (1998). The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Developmental Biology* 198, 319-329.

Marchant, C.L., Malmi-Kakkada A.N., Espina, J.A., Barriga, E.H. (2021). Microtubule deacetylation reduces cell stiffness to allow the onset of collective cell migration in vivo. *BioRxiv*. preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.08.12.456059>

Marchant, C.L., Malmi-Kakkada A.N., Espina J.A., Barriga, E.H. (2022). Cell clusters softening triggers collective cell migration in vivo. *Nat Mater.* 21(11):1314-1323. doi: [10.1038/s41563-022-01323-0](https://doi.org/10.1038/s41563-022-01323-0).

Marrari Y., Crouthamel M., Irannejad R., Wedegaertner P. B. (2007). Assembly and trafficking of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* 46, 7665–7677. [10.1021/bi700338m](https://doi.org/10.1021/bi700338m)

Martino, M. M. and Hubbell, J. A. (2010). The 12th-14th type III repeats of fibronectin function as a highly promiscuous growth factor-binding domain. *FASEB Journal* 24, 4711- 4721.

Maruta, H., Greer K., and Rosenbaum J.L. (1986). The acetylation of α -tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell Biol.* 103:571–579
10.1083/jcb.103.2.571

Matov, A., Applegate, K., Kumar, P., Thoma, C., Krek, W., Danuser, G. and Wittmann, T. (2010). Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker. *Nature Methods* 7, 761-768.

Matsuyama, A., Shimazu T., Sumida Y., Saito A., Yoshimatsu Y., Seigneurin-Berny D., Osada H., Komatsu Y., Nishino N., Khochbin S. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* 21:6820–6831
10.1093/emboj/cdf682

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

Mayor, R., Guerrero, N., Young, R. M., Gomez-Skarmeta, J. L. and Cuellar, C. (2000). A novel function for the Xslug gene: Control of dorsal mesendoderm development by repressing BMP-4. *Mechanisms of Development* 97, 47-56

McKeown, S. J., Wallace, A. S., & Anderson, R. B. (2013). Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration. *Developmental Biology*, 373(2), 244–257.
<http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.10.028>

McQuibban, G. A., Butler, G. S., Gong, J. H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I. and Overall, C. M. (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *Journal of Biological Chemistry* 276, 43503-43508.

Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T. and Takeichi, M. (2008). Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell* 135, 948-959.

Mialhe, A., Lafanechère, L., Treilleux, I., Peloux, N., Dumontet, C., Brémond, A., Panh, M. H., Payan, R., Wehland, J., Margolis, R. L. (2001). Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer Research* 61, 5024-5027.

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.

Mimori-Kiyosue, Y., Shiina N., and Tsukita, S. (2000). "The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules," *Current biology*, vol. 10, no. 14, pp. 865-868.

Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S. (2005). CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and

regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *Journal of Cell Biology* 168, 141-153.

Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* 312, 232-237.

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

Montmayeur, J. P., Borrelli E. (1994). Targeting of G alpha i2 to the Golgi by alternative spliced carboxyl-terminal region. *Science* 263, 95–98. 10.1126/science.8272874

Montoya, V., Gutierrez C., Najera O., Leony D., Varela A., Popova J., Rasenick M.M., Das S., Roychowdhury S. (2007). G Protein $\beta\gamma$ Subunits Interact with $\alpha\beta$ and γ Tubulin and Play a Role in Microtubule Assembly in PC12 Cells. *Cell Motility and Cytoskeleton*. 64:936–50.

Moore, R., Theveneau E., Pozzi S., Alexandre P., Richardson J., Merks A., Parsons M., Kashef J., Linker C., Mayor R. (2013). Par3 controls neural crest migration by promoting microtubule catastrophe during contact inhibition of locomotion. *Development*. 140(23):4763-75. doi: 10.1242/dev.098509.

Moury, J. D. and Jacobson, A. G. (1990). The origins of neural crest cells in the axolotl. *Developmental Biology* 141, 243-253.

Muller, L., Picart R., Barret A., Bockaert J., Homburger V., Tougard C. (1994). Identification of multiple subunits of heterotrimeric G proteins on the membrane of secretory granules in rat prolactin anterior pituitary cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 5, 556–566. 10.1006/mcne.1994.1068

Murrell, M., Oakes, P. W., Lenz, M. and Gardel, M. L. (2015). Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 486-498. <https://doi.org/10.1038/nrm4012>

Mumby, S. M., Linder M. E. (1994). Myristoylation of G protein alpha subunits. *Methods Enzymolo.* 237:254–268

Murphy, A. M. and Montell, D. J. (1996). Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and Rho1 in *Drosophila* oogenesis. *Journal of Cell Biology* 133, 617-630

Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A. and Ohno, S. (2002). Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes to Cells* 7, 1161-1171.

Nakamura, M., Zhou, X. Z. and Lu, K. P. (2001). Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Current Biology* 11, 1062-1067.

Nehlig, A. Molina, Rodrigues-Ferreira S., Honoré S., and Nahmias C. (2017). "Regulation of end-binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 74, no. 13, pp. 2381-2393.

Neptune, E. R., Bourne, H. R. (1997). Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14489–14494. [10.1073/pnas.94.26.14489](https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14489)

Neptune, E. R., Iiri T., Bourne H. R. (1999). Gα_h is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 274, 2824–2828.

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

Nobes, C. D. & Hall, A. (1995) Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.

Odde, D. J., Ma, L., Briggs, A. H., DeMarco, A. and Kirschner, M. W. (1999). Microtubule bending and breaking in living fibroblast cells. *Journal of Cell Science* 112, 3283-3288.

Ogier-Denis E., Couvineau A., Maoret J. J., Hourii J. J., Bauvy C., De Stefanis D. (1995). A heterotrimeric Gi3-protein controls autophagic sequestration in the human colon cancer cell line HT-29. *J. Biol. Chem.* 270, 13–16. [10.1074/jbc.270.1.13](https://doi.org/10.1074/jbc.270.1.13)

Oka, Y., Saraiva, L. R., Kwan, Y. Y., & Korsching, S. I. (2009). The fifth class of Gα_h proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(5), 1484–1489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809420106>

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

Olesnicki Killian, E. C., Birkholz, D. A. and Artinger, K. B. (2009). A role for chemokine signaling in neural crest cell migration and craniofacial development. *Developmental Biology* 333, 161-172.

Palamidessi, A., Frittoli, E., Garre, M., Faretta, M., Mione, M., Testa, I., Diaspro, A., Lanzetti, L., Scita, G. & Di Fiore, P. P. (2008) Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell* 134, 134–135.

Parri, M., & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 8(1), 23. <http://doi.org/10.1186/1478-811X-8-23>

Pegtel, D. M., Ellenbroek, S., Mertens, A., van der Kammen, R. A., de Rooij, J. and Collard, J. G. (2007) The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Curr. Biol.* 17, 1623–1634.

Pellegrin, S., and Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 20), 3491–3499. <https://doi.org/10.1242/jcs.018473>

- Pelletier, A. J., Van der Laan, L. J. W., Hildbrand, P., Siani, M. A., Thompson, D. A., Dawson, P. E., Torbett, B. E. and Salomon, D. R. (2000). Presentation of chemokine SDF1 α by fibronectin mediates directed migration of T cells. *Blood* 96, 2682-2690.
- Perez, F., Diamantopoulos, G. S., Stalder, R. and Kreis, T. E. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* 96, 517-527.
- Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J. K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *Journal of Cell Biology* 174, 839-849.
- Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A. T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L. and Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *Journal of Cell Biology* 185, 1159-1166
- Pero R. S., Borchers M. T., Spicher K., Ochkur S. I., Sikora L., Rao S. P. (2007). Galphai2-mediated signaling events in the endothelium are involved in controlling leukocyte extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4371–4376. 10.1073/pnas.0700185104
- 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.
- Pimplikar S. W., Simons K. (1993). Regulation of apical transport in epithelial cells by a Gs class of heterotrimeric G protein. *Nature* 362, 456–458. 10.1038/362456a0
- Pines, M., Santora A., Spiegel A. (1986). Effects of phorbol esters and pertussis toxin on agonist-stimulated cyclic AMP production in rat osteosarcoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 35, 3639–3641
- Piperno, G., LeDizet M., and Chang X.J. (1987). Microtubules containing acetylated α -tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell Biol.* 104:289–302 10.1083/jcb.104.2.289
- Pollard, T. D. & Cooper, J. A. (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208–1212.
- Poon, J., Fries A., Wessel G. M., Yajima M. (2019). Evolutionary modification of AGS protein contributes to formation of micromeres in sea urchins. *Nat. Commun.* 10, 3779. 10.1038/s41467-019-11560-8
- Preininger, A. M., Van Eps N., Yu N-J., Medkova M., Hubbel W. L., Hamm H. (2003). The myristoylated amino terminus of Galpha(i)(1) plays a critical role in the structure and function of Galpha(i)(1) subunits in solution. *Biochemistry* 42, 7931–7941. 10.1021/bi0345438

Quintyne, N. J., Gill, S. R., Eckley, D. M., Crego, C. L., Compton, D. A. and Schroer, T. A. (1999). Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. *Journal of Cell Biology* 147, 321-334

Redd, M. J., Kelly, G., Dunn, G., Way, M. and Martin, P. (2006). Imaging macrophage chemotaxis in vivo: Studies of microtubule function in zebrafish wound inflammation. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63, 415-422.

Reed, N. A., Cai, D., Blasius, T. L., Jih, G. T., Meyhofer, E., Gaertig, J. and Verhey, K. J. (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current Biology* 16, 2166-2172

Reilein, A. and Nelson, W. J. (2005). APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. *Nature Cell Biology* 7, 463-473

Rhee, S., Jiang, H., Ho, C. H. and Grinnell, F. (2007). Microtubule function in fibroblast spreading is modulated according to the tension state of cell-matrix interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5425-5430

Ridley, A. J. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.

Ridley, A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G., Parsons J. T. and Horwitz A.R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–1709.

Robbins, J. R., McGuire, P. G., Wehrle-Haller, B. and Rogers, S. L. (1999). Diminished matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in ectomesenchyme-derived tissues of the Patch mutant mouse: Regulation of MMP-2 by PDGF and effects on mesenchymal cell migration. *Developmental Biology* 212, 255-263.

Rogers, S. L., Rogers, G. C., Sharp, D. J. and Vale, R. D. (2002). Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *Journal of Cell Biology* 158, 873-884.

Roth D, Fitton BP, Chmel NP, Wasiluk N, Straube A. (2019) Spatial positioning of EB family proteins at microtubule tips involves distinct nucleotide-dependent binding properties. *J Cell Sci.* 132(4):jcs219550. doi: 10.1242/jcs.219550.

Rottner, K., Hall, A. and Small, J. V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Current Biology* 9, 640-648.

Rottner, K., & Schaks, M. (2019). Assembling actin filaments for protrusion. *Current Opinion in Cell Biology*, 56, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.09.004>

Roubinet, C., Tran P. T., Piel M. (2012). Common mechanisms regulating cell cortex properties during cell division and cell migration. *Cytoskeleton* 69, 957–972. 10.1002/cm.21086

Roychowdhury, S., Rasenick MM. (1997). G protein beta1gamma2 subunits promote microtubule assembly. *J Biol Chem*. 272:31476–31581.

Roychowdhury, S., Panda D, Wilson L, Rasenick MM. (1999). G protein alpha subunits activate tubulin GTPase and modulate microtubule polymerization dynamics. *J Biol Chem*. 274:13485–13490.

Roychowdhury, S., Martinez L, Salgado L, Das S, Rasenick MM. (2006). G protein activation is prerequisite for functional coupling between G α /G $\beta\gamma$ and tubulin/microtubules. *Biochem Biophys Res Commun*. 340:441–448.

Roychowdhury, S., Rasenick MM. (2008). Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of microtubule assembly by heterotrimeric Gproteins. *FEBS J*. 275(19):4654-63. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06614.x.

Salaycik, K. J., Fagerstrom, C. J., Murthy, K., Tulu, U. S. and Wadsworth, P. (2005). Quantification of microtubule nucleation, growth and dynamics in wound-edge cells. *Journal of Cell Science* 118, 4113-4122

Sasai, N., Mizuseki, K. and Sasai, Y. (2001). Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. *Development* 128, 2525-2536.

Sasaki K., Kakuwa T., Akimoto K., Koga H., Ohno S. (2015). Regulation of epithelial cell polarity by PAR-3 depends on Girdin transcription and Girdin-Gai3 signaling. *J. Cell Sci*. 128, 2244–2258. 10.1242/jcs.160879

Sato T. S., Handa A., Priya S., Watal P., Becker R. M., and Sato Y. (2019) Neurocristopathies: Enigmatic Appearances of Neural Crest Cell-derived Abnormalities. *RadioGraphics* 39:7, 2085-2102

Schek lli, H. T., Gardner, M. K., Cheng, J., Odde, D. J. and Hunt, A. J. (2007). Microtubule assembly dynamics at the nanoscale. *Current Biology* 17, 1445-1455.

Schiller, H. B., Hermann, M. R., Polleux, J., Vignaud, T., Zanivan, S., Friedel, C. C., Sun, Z., Raducanu, A., Gottschalk, K. E. & Thery M. (2013) Beta1 and alpha v-class integrins

cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat.Cell.Biol.* 15, 625–636.

Schulze, E., Asai, D. J., Bulinski, J. C. and Kirschner, M. (1987). Posttranslational modification and microtubule stability. *Journal of Cell Biology* 105, 2167-2177.

Schurmann A., Rosenthal W., Schultz G., Joost H. G. (1992). Characterization of GTP-binding proteins in Golgi associated membrane vesicles from rat adipocytes. *Biochem. J.* 283, 795–801. [10.1042/bj2830795](https://doi.org/10.1042/bj2830795)

Schwarz U. S., Gardel M. L. (2012). United we stand: Integrating the actin cytoskeleton and cellmatrix adhesions in cellular mechanotransduction. *J. Cell Sci.* 125, 3051–3060. [10.1242/jcs.093716](https://doi.org/10.1242/jcs.093716)

Selleck, M. A. J. and Bronner-Fraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest: The role of neural plate-epidermal interactions. *Development* 121, 525-538.

Serre, L. Stoppin-Mellet, V. and Arnal, I. (2019). "Adenomatous polyposis coli as a scaffold for microtubule end-binding proteins," *Journal of molecular biology*, vol. 431, no. 10, pp.

Seetharaman S. and Etienne-Manneville S. (2020). "Cytoskeletal crosstalk in cell migration," *Trends in cell biology*.

Schaks, M. Giannone, G. and Rottner, K. (2019). "Actin dynamics in cell migration," *Essays in Biochemistry*, vol. 63, no. 5, pp. 483-495.

Shpetner, H. S. & Vallee, R. B. (1992) Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature* 733, 355.

Sive, H., Grainger, R., Harland, R. (2000). *Early Development of Xenopus laevis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 338pp.

Slep, K. C., Rogers, S. L., Elliott, S. L., Ohkura, H., Kolodziej, P. A. and Vale, R. D. (2005). Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *Journal of Cell Biology* 168, 587-598.

Smith, M. A., Blankman, E., Gardel, M. L., Luetjohann, L., Waterman, C. M., Beckerle, M. C. (2010) A zyxin-mediated mechanism for actin stress fiber maintenance and repair. *Dev.Cell.* 19, 365–376.

Sohrmann, M. and Peter, M. (2003). Polarizing without a cue. *Trends in Cell Biology* 13, 526-533.

Spiering, D., & Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhesion & Migration*, 5(2), 170–180. <http://doi.org/10.4161/cam.5.2.14403>

Srinivasan D. G., Fisk R. M., Xu H., van den Heuvel S. (2003). A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C. elegans*. *Genes Dev.* 17, 1225–1239. 10.1101/gad.1081203

Stehbens, S., Wittmann, T. (2012) Targeting and transport: how microtubules control focal adhesion dynamics. *J. Cell Biol.* 9, 198-481.

Stepanova, T., Slemmer, J., Hoogenraad, C. C., Lansbergen, G., Dortland, B., De Zeeuw, C. I., Grosveld, F., Van Cappellen, G., Akhmanova, A. and Galjart, N. (2003). Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *Journal of Neuroscience* 23, 2655-2664.

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

Stow J. L., de Almeida J. B., Narula N., Holtzman E. J., Ercolani L., Ausiello D. A. (1991). A heterotrimeric G protein, G α i-3, on Golgi membranes regulates the secretion of a heparan sulfate proteoglycan in LLC-PK1 epithelial cells. *J. Cell Biol.* 114, 1113–1124.

Straube, A. and Merdes, A. (2007). EB3 Regulates Microtubule Dynamics at the Cell Cortex and Is Required for Myoblast Elongation and Fusion. *Current Biology* 17, 1318-1325.

Sun, Z., Guo, S. S., Fässler, R. (2016) Integrin-mediated mechanotransduction. *J Cell Biol.* 215, 445–456.

Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T. and Ohno, S. (2001). Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved PAR protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *Journal of Cell Biology* 152, 1183-1196.

Svetic, V., Hollway, G. E., Elworthy, S., Chipperfield, T. R., Davison, C., Adams, R. J., Eisen, J. S., Ingham, P. W., Currie, P. D. and Kelsh, R. N. (2007). Sdf1a patterns zebrafish melanophores and links the somite and melanophore pattern defects in choker mutants. *Development* 134, 1011-1022

Svitkina, T. M., & Borisy, G. G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *The Journal of Cell Biology*, 145(5), 1009–1026.

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. doi: 10.1083/jcb.201602083. Epub 2016 May 30. PMID: 27241911; PMCID: PMC4896058.

Szabó, A., Mayor R. (2018). Mechanisms of Neural Crest Migration. *Annu Rev Genet.*52:43-63. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031559.

Tamar, A. and Schlaepfer, D. D. (2009) Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 676–683.

Tapon, N. and Hall, A. (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 86–92.

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.

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

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

Thompson B. D., Jin Y., Wu K. H., Colvin R. A., Luster A. D., Birnbaumer L. (2007). Inhibition of G alpha i2 activation by G alpha i3 in CXCR3-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 9547–9555. 10.1074/jbc.M610931200

Thyberg, J., and Moskalewski S.. (1993). Relationship between the Golgi complex and microtubules enriched in detyrosinated or acetylated alpha-tubulin: studies on cells recovering from nocodazole and cells in the terminal phase of cytokinesis. *Cell Tissue Res.* 273:457–466 10.1007/BF00333700

Tirnauer, J. S., O'Toole, E., Berrueta, L., Bierer, B. E. and Pellman, D. (1999). Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *Journal of Cell Biology* 145, 993-1007.

Tirnauer, J. S. and Bierer, B. E. (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *Journal of Cell Biology* 149, 761-766.

Toro-Tapia, G., Villaseca, S., Beyer, A., Roycroft, A., Marcellini, S., Mayor, R., Torrejón, M. (2018). "The Ric-8A/Gα13/FAK signaling cascade controls focal adhesion formation during neural crest cell migration," *Development*, vol. 145, no. 22, p. dev164269, doi: 10.1242/dev.164269.

Tran, A.D., Marmo T.P., Salam A.A., Che S., Finkelstein E., Kabarriti R., Xenias H.S., Mazitschek R., Hubbert C., Kawaguchi Y. 2007. HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J. Cell Sci.* 120:1469–1479 10.1242/jcs.03431

- Tribulo, C., Aybar, M. J., Sanchez, S. S. and Mayor, R. (2004). A balance between the antiapoptotic activity of Slug and the apoptotic activity of *msx1* is required for the proper development of the neural crest. *Developmental Biology* 275, 325-342.
- Vallin, J., Thuret, R., Giacomello, E., Faraldo, M. M., Thiery, J. P. and Broders, F. (2001). Cloning and Characterization of Three *Xenopus* Slug Promoters Reveal Direct Regulation by Lef/ β -Catenin Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 276, 30350-30358.
- Vega, S., Morales, A. V., Ocaña, O. H., Valdés, F., Fabregat, I. and Nieto, M. A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes and Development* 18, 1131-1143.
- Villaseca, S. (2017) Estudio de la función de las proteínas Gai2 y Ric-8A en la polarización durante la migración de células de la Cresta Neural Craneal en *Xenopus*. Tesis de Magister. Universidad de Concepción
- Villaseca, S., Romero, G., Ruiz, M.J., Pérez, C., Leal, J.I., Tovar, L.M., Torrejón M. (2022). Gai protein subunit: A step toward understanding its non-canonical mechanisms. *Front Cell Dev Biol.* 10:941870. doi: 10.3389/fcell.2022.941870.
- Wadsworth, P. and McGrail, M. (1990). Interphase microtubule dynamics are cell typespecific. *Journal of Cell Science* 95, 23-32.
- Ward, J. D., Ha, J. H., Jayaraman, M. & Dhanasekaran, D. N. (2015) LPA-mediated migration of ovarian cancer cells involves translocalization of Gai2 to invadopodia and association with Src and β -pix. *Cancer Letters* 356, 382–391.
- Watanabe, N., & Mitchison, T. J. (2002). Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1083–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1067470>
- Waterman-Storer, C. M. and Salmon, E. D. (1997). Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *Journal of Cell Biology* 139, 417-434
- Waterman-Storer, C. M., Worthylake R. A., Liu B. P., Burridge K., Salmon E. D. (1999). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol* 1:45–50
- Webster, D.R., and Borisy G.G. (1989). Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J. Cell Sci.* 92:57–65
- Weijer, C. J. (2009). Collective cell migration in development. *J. Cell Sci.* 122, 3215–3223
- Weiss-Haljiti, C., Pasquali C., Ji H., Gillieron C., Chabert C., Curchod M. L. (2004). Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma, Rac, and PAK signaling in chemokine-

induced macrophage migration. *J. Biol. Chem.* 279, 43273–43284. 10.1074/jbc.M402924200

Wen, Y., Eng, C. H., Schmoranzler, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E. J. S., Chen, M., Wallar, B. J., Alberts, A. S. and Gundersen, G. G. (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nature Cell Biology* 6, 820–830.

Wiege, K., Le D. D., Syed S. N., Ali S. R., Novakovic A., Beer-Hammer S. (2012). Defective macrophage migration in *Gai2*- but not *Gai3*-deficient mice. *J. Immunol.* 189, 980–987. 10.4049/jimmunol.1200891

Wilson, B. S., Palade G. E., Farquhar M. G. (1993). Endoplasmic reticulum-through-Golgi transport assay based on O-glycosylation of native glycoporphin in permeabilized erythroleukemia cells: Role for *Gi3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1681–1685. 10.1073/pnas.90.5.1681

Wong, Y. H., Federman A., Pace A. M., Zachary I., Evans T., Pouyssegur J.I. (1991). Mutant alpha subunits of *Gi2* inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature* 351, 63–65. 10.1038/351063a0

Woodard, G. E., Huang N-N., Cho H., Miki T., Tall G. G., Kehrl J. H. (2010). Ric-8A and *Gi* alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3519–3530. 10.1128/MCB.00394-10

Woods, A., Longley, R. L., Tumova, S. and Couchman, J. R. (2000). Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374, 66-72.

Xiao, R. P., Avdonin P., Zhou Y. Y., Cheng H., Akhter S. A., Eschenhagen T. (1999). Coupling of β 2-adrenoceptor to *Gi* proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ. Res.* 84, 43–52. 10.1161/01.res.84.1.43

Yadav, S., Puri S., and Linstedt A.D. (2009). A primary role for Golgi positioning in directed secretion, cell polarity, and wound healing. *Mol. Biol. Cell.* 20:1728–1736 10.1091/mbc.E08-10-1077

Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A. and Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-

6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Current Biology* 13, 734-743.

Yoshigi, M., Hoffman, L. M., Jensen, C. C., Yost, H. J. & Beckerle, M. C. (2005) Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J.Cell.Biol.* 171, 209–215.

Yue, J., Xie, M., Gou, X., Lee, P., Schneider, M. D. and Wu, X. (2014) Microtubules regulate focal adhesion dynamics through MAP4K4. *Dev. Cell* 31, 572–85.

Zarbock A., Deem T. L., Burcin T. L., Ley K. (2007). Galphai2 is required for chemokine-induced neutrophil arrest. *Blood* 110, 3773–3779. 10.1182/blood-2007-06-094565

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.

Zimmerman, B., Volberg, T. and Geiger, B. (2004) Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 58, 143–159.

Zovko, S., Abrahams, J. P., Koster, A. J., Galjart, N. and Mommaas, A. M. (2008). Microtubule plus-end conformations and dynamics in the periphery of interphase mouse fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell* 19, 3138-3146.

Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A. A. and Nathke, I. S. (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3B phosphorylation. *Current Biology* 11, 44-49.