



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Estudio de la proteína FGD6 como un nuevo regulador de la organización dinámica del citoesqueleto de actina neuronal

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Daniela Inés Galván

Directora de tesis: Dra. Corina Ileana García

Director Adjunto: Dr. Eduardo Miguel Castaño

Consejera de estudios: Eleonora Katz

Lugar de trabajo: IIBBA-CONICET; Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2022

Lic. Daniela Inés Galván

Dra. Corina García

Eduardo Miguel Castaño

ESTUDIO DE LA PROTEÍNA FGD6 COMO UN NUEVO REGULADOR DE LA ORGANIZACIÓN DINÁMICA DEL CITOESQUELETO DE ACTINA NEURONAL

En el Sistema Nervioso Central (SNC), procesos biológicos esenciales en las neuronas, como la morfología y la sinaptogénesis, requieren de la remodelación del citoesqueleto de actina. La misma es coordinada por Rho GTPasas (RhoA, Rac1 y Cdc42), que oscilan entre un estado activo con GTP y uno inactivo con GDP mediados por GEFs y GAPs con localización y actividad específicas. FGD6, sin función conocida en SNC, pertenece a una familia de proteínas con una organización estructural que le permitiría actuar como nexo entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina. Recientemente se describió una asociación de FGD6 con Cdc42 y Rac1.

El objetivo general de esta tesis es estudiar la relevancia funcional de FGD6 y su posible participación regulando el citoesqueleto neuronal. Nuestra hipótesis es que, en las neuronas, FGD6 modularía la actividad de las Rho GTPasas fundamentales en la reorganización del citoesqueleto de actina y, por lo tanto, de procesos tales como la diferenciación, la polarización y la neuritogénesis.

Los estudios *in silico* de la estructura terciaria determinaron que la región N-terminal de FGD6 es intrínsecamente desordenada, con mayor probabilidad de interactuar con otros dominios/ proteínas ordenadas y conteniendo varios sitios de fosforilación. La expresión del ARNm de FGD6 mostró una regulación durante la diferenciación neuronal *in vitro*. La inhibición parcial de FGD6 produjo un aumento significativo en la actividad basal de Rac1, sugiriendo que FGD6 estaría modulando negativamente a esta GTPasa y consecuentemente, a las proteínas efectoras ubicadas río abajo de la vía. Rac1 activa una cascada de fosfo/desfosforilaciones que incluye a PAK, LIMK y Cofilina, que finaliza con la polimerización de los monómeros de actina y la regulación del *turnover* de los filamentos de actina. El complejo Arp2/3 es indispensable para generar las ramificaciones de actina, siendo las subunidades Arp2 y Arp3 los principales actores del complejo nucleador. Con el silenciamiento de FGD6 no se observaron diferencias en los niveles de fosforilación de Cofilina ni de LIMK1, ni en los niveles de Arp3 pero sí de Arp2 (sin cambios en su ARNm). La interferencia de FGD6 produjo además alteraciones morfológicas en las células y una disminución drástica en la marcación de actina filamentosa (F-actina), sin cambios en el contenido total de actina. Así, la hiperactividad

de Rac1, la modificación de la estequiometría del complejo Arp2/3 y de la F-actina, podrían impactar en la regulación de la correcta función neuronal.

Mutaciones en FGD6 se asocian con degeneración macular, autismo y epilepsia. El Neuroepitelio generado a partir de células pluripotentes inducidas de pacientes con Epilepsia Focal Autolimitada de la Infancia (SFEC) presentó una acumulación anómala de la proteína en el citoplasma y la membrana plasmática. Los fibroblastos de los pacientes presentaron el citoesqueleto de actina alterado, similar a lo descrito con el silenciamiento; recapitulando los hallazgos *in vitro* y acompañando la hipótesis de que FGD6 mutado en SFEC ha perdido/disminuido su función, afectando el citoesqueleto y perturbando la actividad neuronal, como se reportó previamente.

En conclusión, la expresión de FGD6 se encuentra finamente regulada en las neuronas y su inhibición afecta vías intracelulares que impactan en el citoesqueleto de actina, pudiendo así alterar la función celular. Los resultados presentados en esta Tesis permiten comenzar a esclarecer el mecanismo por el cual FGD6 modula vías de señalización de Rac1, pudiendo ser de manera directa y/o indirecta, a través de factor(es) que interacciona(n) con los distintos componentes de las mismas. Finalmente, los resultados obtenidos ayudan a comprender la posible contribución de FGD6 a la fisiopatología de enfermedades neurológicas como la SFEC.

Palabras Clave: FGD6, neurona, Rho GTPasas, citoesqueleto, actina.

STUDY OF FGD6 PROTEIN AS A NOVEL REGULATOR OF NEURONAL ACTIN CYTOSKELETON DYNAMIC ORGANIZATION

In the Central Nervous System (CNS), essential biological processes in neurons, such as morphology and synaptogenesis, involve remodeling of the actin cytoskeleton. These cytoskeletal rearrangements are coordinated by Rho GTPases (RhoA, Rac1 and Cdc42) which act as switches cycling between active (GTP-bound) and inactive (GDP-bound) states mediated by GEFs and GAPs with specific location and activity. FGD6 belongs to a family of proteins with multidomain organization that may function as signaling scaffold between plasma membrane and the actin cytoskeleton. Although FGD6 is expressed in neurons, its function is not established and the association with Cdc42 and Rac1 was recently described.

The aim of this thesis is to study the functional relevance of FGD6 and its potential role regulating neuronal cytoskeleton. Our hypothesis is that, in neurons, FGD6 would modulate the activity of key Rho GTPases for actin cytoskeleton reorganization and, therefore, processes such as differentiation, polarization and neuritogenesis.

In silico studies of FGD6 tertiary structure determined that the N-terminal region is intrinsically disordered, most likely to interact with other ordered domains/proteins, and containing several phosphorylation sites. We observed a modulation of FGD6 expression during neuronal differentiation *in vitro*. FGD6 knockdown results in Rac1 basal activation, suggesting that FGD6 would negatively modulate this GTPase and, consequently, its downstream effector proteins. Rac1 activates a cascade of phospho/dephosphorylations that includes PAK, LIMK and Cofilin, which ends with the polymerization of actin monomers and the regulation of actin filament turnover. The ARP2/3 complex is essential for actin filament branching, being Arp2 and Arp3 subunits the main actors of the nucleator complex. In FGD6 knockdown conditions no differences were observed neither in Cofilin or LIMK1 phosphorylation nor in Arp3 levels. However, a decrease in FGD6 expression resulted in a significant reduction in Arp2 protein levels (without affecting its mRNA), along with changes in cell morphology and a decrease in F-actin staining, with no modification of total actin pool. Therefore, Rac1 hyperactivity, the imbalance of Arp2/3 complex stoichiometry and F-actin disassembly, could impact in proper neuronal function.

FGD6 mutations are associated with macular degeneration, autism, and epilepsy. In Neuroepithelium generated with induced pluripotent cells from Self-limited Focal Epilepsy of Childhood (SFEC) patients, we observed an abnormal protein accumulation in the cytoplasm and the plasma membrane. Fibroblasts from these patients displayed an altered actin cytoskeleton, similar to FGD6 knockdown experiments; recapitulating *in vitro* observations and supporting the hypothesis that FGD6 mutation in SFEC may induce loss/decreased protein function, thus affecting cytoskeleton and impairing neuronal activity previously reported in these patients.

In conclusion, FGD6 expression is tightly regulated in neurons and its inhibition affects intracellular pathways that impact on actin cytoskeleton, which may in turn hamper neuronal functions. The results presented in this Thesis contribute to shed some light on the mechanism by which FGD6 modulates Rac1 signaling pathways, directly and/or indirectly, through factor(s) that interact(s) with different components along the axis. Finally, the results described here contribute to understand FGD6 potential involvement in the pathophysiology of neurological diseases such as SFEC.

Keywords: FGD6, neuron, Rho GTPases, cytoskeleton, actin.

*“I'd made it this far and refused to
give up because all my life I had
always finished the race.”*

Louis Zamperini (1917-2014)

El primer año de tesis se incendió mi lugar de trabajo, el tercer año de tesis sufrí abusos de autoridad y me vi obligada a cambiarme de laboratorio, el cuarto año de tesis mi trabajo se pauso por la pandemia y en el final de mi tesis, me separé después de 7 años de relación y tuve que volver a la casa de mis padres.

Agradecimientos

- ♥ En primer lugar, quiero agradecer al CONICET por financiar mi trabajo durante el desarrollo de mi doctorado y a la UBA por haberme brindado una formación académica gratuita y de excelente calidad durante todos los años de mi formación profesional.
- ♥ A la comunidad FIL toda: investigadores, becarios, técnicos, personal de administración, mantenimiento, biblioteca, droguero y limpieza, que hacen del Instituto un lugar agradable para trabajar y lleno de buena predisposición. A todos los becarios del Instituto que siempre están dispuestos a apoyarse mutuamente y de manera incondicional.
- ♥ Agradezco a Alexandra Elbakyan por “eliminar todas las barreras en el camino de la ciencia” y haberme facilitado siempre el acceso a información de vital importancia.
- ♥ Agradezco a Eduardo Castaño por recibirme en su laboratorio a mitad de mi doctorado, por su co-dirección, capacidad crítica y enseñanzas.
- ♥ Gracias a Corina García, sin dudas la directora más exigente pero también una excelente profesional de la cual aprendí a trabajar en la mesada, a diseñar los experimentos y a analizar con criterio los resultados obtenidos. Gracias por la paciencia en mis comienzos, por darme libertades en la toma de decisiones a mitad de camino y por permitirme elegir el final.
- ♥ Gracias a todas las personas que integran el Laboratorio de Envejecimiento Cerebral y Neurodegeneración (“al 104”), así como también a las personas que ya no están en el labo pero han pasado por allí en estos años: Lautaro, Gise, Karen, Lorenzo, Pablo y Laura, les agradezco por hacer del lab un ambiente cálido y amigable para trabajar.
- ♥ A los laboratorios 102, 103, 106 y 107/8, por su ayuda desinteresada, por compartir generosamente reactivos, protocolos, consejos y risas en almuerzos o pasillos.
- ♥ Afortunadamente puedo decir que conocí a personas hermosas durante mi doctorado: Brendis, Coni, Diana, Estub, Gise, Jean, Lautaro y Viqui. Amigos con

los que compartí charlas, risas y meriendas. Pero también, personas que iluminaron los momentos más oscuros y tristes, personas que siempre estuvieron para mí de manera incondicional, que con solo un abrazo encendían mi corazón y que sin duda formarán parte del resto de mi vida:

Brendis, querida amiga nunca voy a olvidar que en mi temporada gris no hubo ni un solo día que no me hayas mandado un mensaje para saber cómo estaba, gracias por todas las veces que me escuchaste, gracias por compartir tu selección de podcasts, por hacerme un lugarcito en el *flyroom* para refugiarme, por todas las charlas que tuvimos y por haberme acompañado siempre y en todo.

Coni, sin dudas sos una de las personas más buenas y desinteresadas que conozco, gracias por todas las charlas que tuvimos, por haber pasado por el lab durante mucho tiempo sólo para saber cómo estaba, por cocinarme chipa para alegrarme un poquito los días tristes, por tus consejos y por estar siempre.

Diana, gracias por ser mi amiga de los pasillos de FIL, por las charlas a nivel experimental en el cuarto de cultivo y por las charlas a nivel personal en los pasillos, gracias por compartir tus delicias dulces de los viernes y por haberme ofrecido ir a tu casa cuando yo estaba super inestable en la mía.

Estub, de todas tus virtudes la que más valoro es que SIEMPRE estás dispuesto a ayudar a los demás (aun cuando eso implica dejar de lado lo que estás haciendo para vos) y lo haces de manera totalmente desinteresada, sin dudas sos “el mejor compañero”. Gracias por todas las veces que me ayudaste, no solo con cosas de la mesada sino con la vida misma, gracias por tus charlas contenedoras, por haberte preocupado siempre por mí y por compartir todas las cosas ricas que cocinas.

Gise, gracias por abrirme las puertas de tu casa, por permitirme ser yo misma en un “espacio libre de críticas y prejuicios”, por cada vez que me tranquilizaste, por cada charla profunda que tuvimos y por bancarme en todas.

Jean, a mi tocaya zodiacal invertida, quiero que sepas que fue increíble encontrar a una amiga con la cual compartir la forma de ver la vida y coincidir en las formas de pensar, gracias por enseñarme a dar gracias por las pequeñas cosas buenas de cada día, por escribirme ni bien te enteraste de lo que me había pasado, por

tus palabras tranquilizadoras y por hacerme saber que más allá de la distancia siempre voy a poder contar con vos.

Lautaro, por todas las charlas que tuvimos en los pasillos de FIL pasando por infinidad de temáticas (incluido el miedo a volar y las estadísticas de porque es súper seguro jaja), por haberte preocupado por cómo estaba cuando fue el cambio de laboratorio, por haberme escuchado cada vez que necesité hablar, por explicarme cada duda que tuve y por darme la bienvenida al L104.

Viqui, por acompañarme en los momentos difíciles y hacerme sentir que en algún momento todo iba a estar bien, por las charlas en las meriendas, por tus palabras de aliento, por tu cariño y contención.

- ♥ A mis padres, que siempre me enseñaron que lo más importante era la educación, por haberme bancado para que pudiera dedicarme solo a estudiar durante la carrera de biología y por apoyarme en todas las decisiones que tome. Por abrirme las puertas de su casa nuevamente a mis 32 años, por la enorme paciencia que me tuvieron cuando estaba enojada o profundamente triste, por hacerme las cosas lo más fáciles posibles para que solo tuviera que ocuparme de escribir la Tesis. A mi padre por respetar mi espacio y mis silencios. A mí madre por no respetarlos y querer estar siempre presente para consolarme. Gracias por hacer posible que pudiera terminar mi doctorado. A mí hermana, sin importar lo diferente que podamos ser o pensar, siempre te preocupaste por mi bienestar y me demostraste lo mucho que me quieres y me apoyas. La presencia de los tres en mi vida es fundamental para todos mis logros.
- ♥ A quien considero como una segunda madre: Martí, gracias por hacerme parte de tu familia, por preocuparte por mí y velar siempre por mis intereses, por remarcarme que lo más importante es la formación profesional, por tus palabras de aliento y cariño. Gracias por creer en mí y por impulsarme a seguir. Gracias a Ati, por escribirme cuando estuve mal y hacerme saber que contaba con tu apoyo. Y gracias a Fran, por tu preocupación y cariño sincero, por todas las veces que me diste el espacio para hablar de mis emociones y por mandarme fotos de un Gini de la suerte con mucho amor y fuerzas.

A mi familia y amigos

ÍNDICE

ABREVIATURAS	18
INTRODUCCIÓN	20
1- Citoesqueleto de actina	21
1.1 Citoesqueleto neuronal.....	21
1.2 Actina como componente del citoesqueleto neuronal.....	23
1.3 Proteínas de unión a actina (ABP).....	25
1.3.1 ABP en la regulación de la extensión de actina F: ADF/ Cofilina.....	26
1.3.2 ABP en la ramificación de actina F: complejo Arp2/3.....	28
2- Rho GTPasa Rac1	29
2.1 Familia de Rho GTPasas en el Sistema Nervioso.....	29
2.2 Las Rho GTPasas presentan actividad cíclica regulada por GEFs, GAPs y GDIs.....	29
2.3 Las Rho GTPasas actúan como nodos de señalización.....	32
2.4 Crosstalk entre Rho GTPasas.....	34
2.5 Las Rho GTPasas regulan la actividad de proteínas efectoras.....	35
2.6 Rac1 y efectores involucrados en la formación de lamelipodios.....	36
2.7 Rac1 y estructuras subcelulares de actina en neuronas.....	37
2.8 Desregulación de Rac1 en Sistema Nervioso.....	39
3- Proteínas/ regiones intrínsecamente desordenadas (IDP/ IDR)	39
3.1 Definición de IDP/ IDR.....	39
3.2 Características de las IDP/ IDR.....	40
3.3 IDP/ IDR como centros de señalización.....	41
4- FGD6	41
4.1 Familia de FGDs.....	41
4.2 Localización subcelular de las proteínas FGD.....	42
4.3 Actividad funcional de las proteínas FGD: GEF de Rho GTPasas.....	43
4.4 Patologías asociadas a mutaciones en los miembros FGD.....	44
4.5 FGD6 (<i>FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 6</i>).....	45
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
1-Hipótesis	48
2-Objetivo general	48

3-Objetivos específicos	48
RESULTADOS	49
1-Characterización de FGD6: análisis de la región N-terminal de la proteína y expresión del gen durante la diferenciación neuronal	50
1.1 El extremo N-terminal de FGD6 es intrínsecamente desordenado, con alta probabilidad de interactuar con otros dominios/ proteínas ordenadas y conteniendo varios sitios de fosforilación.....	51
1.2 La expresión de FGD6 mostró una modulación durante la diferenciación neuronal <i>in vitro</i>	54
2-Análisis de la organización del citoesqueleto de actina al disminuir la expresión de FGD6	60
2.1 Sistema de trabajo: células de la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH transfectadas con un conjunto de siRNAs específicos para FGD6.....	60
2.2 La disminución de la expresión de FGD6 produjo un aumento significativo en la actividad basal de Rac1, pero no afectó la actividad basal de Cdc42.....	62
2.3 Análisis de proteínas efectoras del citoesqueleto de actina río debajo de Rac1.....	66
2.3.1 La disminución en la expresión de FGD6 no produjo diferencias en los niveles de fosforilación de LIMK1 ni de Cofilina.....	66
2.3.2 La disminución en la expresión de FGD6 produjo una disminución específica de los niveles proteicos de la subunidad Arp2 del complejo Arp2/3.....	68
2.4 La interferencia en la expresión de FGD6 produjo alteraciones morfológicas en las células y una disminución drástica de los filamentos de actina, sin cambios en el contenido total de actina G.....	71
2.5 El silenciamiento parcial de FGD6 no afectó la dinámica de actina.....	73
3-Ánisis de FGD6 en la Epilepsia Focal Autolimitada de la Infancia	76
3.1 El neuroepitelio generado a partir de hiPS de pacientes con SFEC presentó una acumulación anómala de FGD6 en el citoplasma y la membrana plasmática.....	78
3.2 Los fibroblastos con FGD6 ^{G/G} presentaron el citoesqueleto de actina alterado.....	79
DISCUSIÓN	82
Discusiones Generales	83
1-Characterización de FGD6: análisis de la región N-terminal de la proteína y expresión del gen durante la diferenciación neuronal	83

2-Análisis de la organización del citoesqueleto de actina al disminuir la expresión de FGD6	86
3-Ánalisis de FGD6 en la Epilepsia Focal Autolimitada de la Infancia	90
CONCLUSIÓN	93
1-Conclusión final	94
2-Conclusiones generales	95
MATERIALES Y MÉTODOS	96
1-Cultivo celular	97
1.1 Mantenimiento de las células SK-N-SH.....	97
1.2 Mantenimiento de células de fibroblastos humanos y células pluripotentes inducidas (hiPS).....	97
1.2.1 Fibroblastos humanos.....	97
1.2.2 Producción de fibroblastos murinos embrionarios (MEFs).....	98
1.2.3 Células humanas Pluripotentes inducidas (hiPS).....	98
1.3 Protocolos de diferenciación celular.....	99
1.3.1 Diferenciación de células SK-N-SH.....	99
1.3.2 Protocolo de diferenciación de hiPS a Neuroepitelio (NE).....	99
2-Silenciamiento de FGD6 mediante ARN pequeños de interferencia (siRNA)	101
2.1 Muestras para Western Blot o RT-qPCR.....	101
2.2 Muestras para inmunofluorescencia.....	101
3-Cultivo primario de neuronas corticales	102
4-Inmunofluorescencia	103
5-Transmisión de energía de resonancia (FRET)	104
5.1 Vectores Raichu-Rac1 y Raichu-Cdc42.....	104
5.2 FRET.....	105
6-Obtención de actina filamentosa (F) y actina monomérica (G)	105
7-Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western Blot	106
7.1 Extracción de proteínas.....	106
7.2 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida tris-tricina (SDS-PAGE) y Western Blot.....	106

7.2.1 Detección de proteínas por método quimioluminiscente.....	107
7.2.2 Detección de proteínas por método de fluorescencia.....	107
8-Extracción de ARN total y producción de ADN complementario.....	109
8.1 Extracción de ARN total.....	109
8.2 Producción de ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción (RT-PCR)	109
9-Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	109
10-Ánisis estadísticos	111
BIBLIOGRAFÍA.....	112

ABREVIATURAS

ABP: *Actin Binding Protein*; proteína de unión a actina.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNasa: desoxirribonucleasa.

ADNc: ADN complementario.

ADP: difosfato de adenosina.

cAMP: adenosín monofosfato-3',5' cíclico.

AR: ácido retinoico.

ARHGAP33: *Rho GTPase Activating Protein 33*; proteína activadora de la actividad GTPasa 33.

ARHGEF16: *Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 16*; factor intercambiador de nucleótidos de guanina 16.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ARP2/3: *Actin Related Proteins 2/3*; proteínas relacionadas con la actina 2/3

Arpc 1-5: *Actin-Related Protein 2/3 Complex subunit 1-5*; subunidad 1-5 del complejo de proteínas relacionadas con actina 2/3.

ATP: trifosfato de adenosina.

BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*; factor neurotrófico derivado de cerebro.

BrEt: bromuro de etidio.

BSA: *Bovine Serum Albumin*; seroalbúmina bovina.

CDC42: *Cell Division Control protein 42*; proteína 42 del ciclo de división celular.

CFP: *Cyan Fluorescent Protein*; proteína cian fluorescente.

CO₂: dióxido de carbono.

DIV: días *in vitro*.

DMSO: dimetilsulfóxido.

dNTPs: set de 2' deoxinucleósido 5'-trifosfato: dATP, dTTP, dGTP y dCTP.

DTT: ditioneitol.

EDTA: *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*; ácido etildiaminotetra acético.

EGTA: *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*; ácido etilenglicoltetra ácido.

FGD: *Facio Genital Dysplasia*; displasia Facio Genital.

FGD6: *FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 6*.

FGF2: *Fibroblast Growth Factor 2*; factor de crecimiento de fibroblastos básico.

FRET: *Förster Resonance Energy Transfer*; transferencia de energía de resonancia.

GDNF: *Glial Cell line-Derived Neurotrophic Factor*; factor neurotrófico derivado de la glia.

hiPS: *human induced Pluripotent Stem cell*; células humanas pluripotentes inducidas.

IDP: *Intrinsically Disordered Protein*; proteína intrínsecamente desordenada.

- IDR:** *Intrinsically Disordered Region*; región intrínsecamente desordenada.
- IGF-1:** *Insulin-like Growth Factor I*; factor de crecimiento insulínico tipo 1.
- LIMK:** *LIM kinase*; quinasa de dominio LIM.
- MPT:** modificaciones post-traduccionales.
- NE:** neuroepitelio.
- NPF:** *Nucleation-Promoting Factor*; factor promotor de la nucleación.
- OligodT:** secuencia monocatenaria de desoxitimina.
- PAK:** *P21-Activated Kinase*; quinasa activada por p21.
- PB:** *phosphate buffered*; *buffer* fosfato.
- PBS:** *phosphate buffered saline*; *buffer* fosfato salino.
- PBS-T:** *tween 20 - phosphate buffered saline*; *buffer* fosfato salino con Tween 20.
- PBS-Tx:** *Triton X-100 phosphate buffered saline*; *buffer* fosfato salino con Triton X-100.
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.
- PFA:** para-formaldehído.
- PIP3:** fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato.
- PMSF:** *phenylmethylsulfonyl fluoride*; fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
- PVDF:** *polyvinylidene difluoride*; fluoruro de polivinilideno.
- RAC1:** *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*; sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras.
- RT-qPCR:** retrotranscripción seguida de PCR en tiempo real.
- Src:** *Steroid Receptor Coactivator*; Coactivador del receptor de esteroides (tirosina quinasa no receptora).
- SDS:** *sodium dodecyl sulfate*; dodecilsulfato sódico.
- SDS-PAGE:** *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
- SFB:** suero fetal bovino.
- SFEC:** *Self-limited Focal Epilepsy of Childhood*; epilepsias focales autolimitadas a la infancia.
- siRNA:** ARN de interferencia pequeños.
- SNC:** Sistema Nervioso Central.
- TBS:** *tris-buffered saline*; *buffer* Tris-Cl salino.
- TEMED:** tetrametiletildiamina.
- WASP:** *Wiskott–Aldrich Syndrome Protein*; proteína del síndrome de Wiskott–Aldrich.
- WAVE:** *WASP-family Verprolin-homologous protein*; isoformas homólogas de verprolina de la familia WASP.
- YFP:** *Yellow Fluorescent Protein*; proteína amarilla fluorescente.

Introducción

1- CITOESQUELETO DE ACTINA

1.1 Citoesqueleto neuronal

El mantenimiento de la arquitectura del Sistema Nervioso Central es fundamental para el correcto procesamiento de la información, coordinación de movimientos y equilibrio, la memoria y el aprendizaje. Las neuronas son células altamente especializadas y polarizadas que poseen dos compartimentos intracelulares funcionalmente diferentes: el compartimento axonal y el compartimento somato-dendrítico (Craig y Banker, 1994). El axón es una proyección única que funciona como un transmisor de señal, que contacta con las células vecinas y transmite el impulso eléctrico y la información neuronal. El compartimento somato-dendrítico está compuesto por el cuerpo celular neuronal y múltiples dendritas ramificadas que reciben señales. Este reordenamiento polarizado forma la base para que la propagación de la señal sea unidireccional, permitiendo a las neuronas segregar la recepción, la integración y la propagación de la señal a diferentes regiones del Sistema Nervioso. El citoesqueleto es crucial para mantener esta forma y polaridad asimétricas, ya que proporciona no solo la estructura neuronal, sino también porque separa funcionalmente los dos compartimentos (revisado en Schelski y Bradke, 2017).

Durante la diferenciación neuronal ocurre una serie de eventos finamente regulados: la formación y el desarrollo de neuritas (neuritogénesis) y la posterior maduración de una neurita en un axón (axonogénesis) y de las otras neuritas en dendritas (dendritogénesis), y todos estos procesos requieren de una profunda remodelación del citoesqueleto (Compagnucci et al, 2016). Los axones pueden llegar a extenderse grandes distancias (hasta 1 metro en humanos), lo que plantea la necesidad de una maquinaria bien construida que transporte componentes celulares vitales del soma neuronal a lo largo de la proyección axonal (revisado en Kapitein y Hoogenraad, 2011).

Para mantener la integridad de la morfología neuronal se requiere de la organización y la acción coordinada de los tres componentes del citoesqueleto: los microtúbulos, los filamentos intermedios y los microfilamentos de actina (Figura I1) (Avila et al., 2020) (revisado en Kapitein y Hoogenraad, 2015; Hlushchenko et al., 2016; Yuan et al., 2017). Las flexibilidades relativas de estos tres polímeros difieren notablemente, como lo

indican sus longitudes promedio: en orden creciente de flexibilidad, microtúbulos ($5000\mu\text{m}$), filamentos de actina ($13.5\mu\text{m}$) y filamentos intermedios ($0.5\mu\text{m}$) (revisado en Fletcher y Mullins, 2010). Cabe destacar que los componentes del citoesqueleto están formados por proteínas que se pueden ensamblar en una amplia combinación de formas dando lugar a diferentes estructuras. Estas estructuras son dinámicas, ya que las proteínas se pueden desacoplar y volver a ensamblar en otra estructura totalmente diferente dependiendo del contexto celular (revisado en Fletcher y Mullins, 2010).

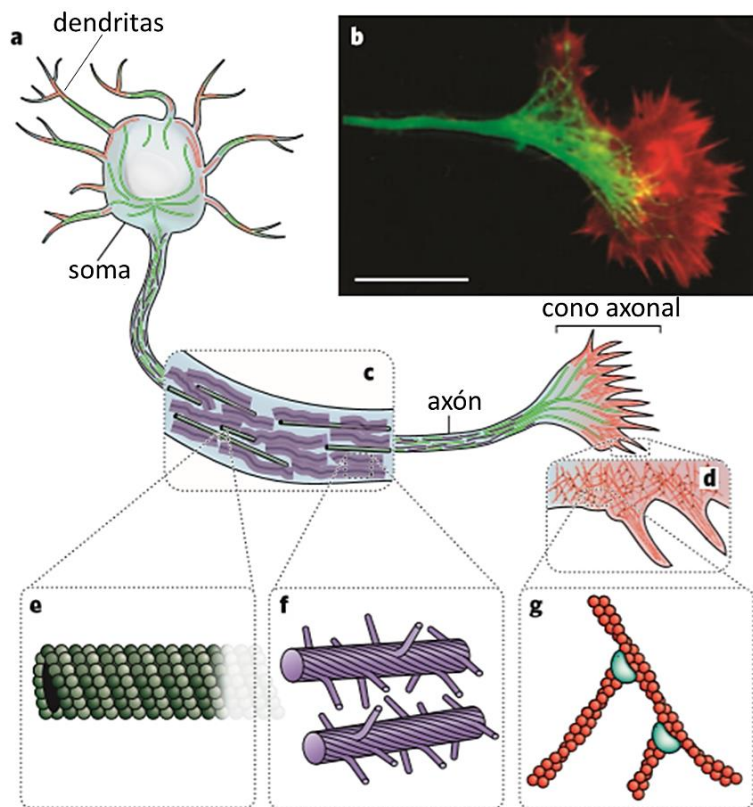


Figura 11. Componentes del citoesqueleto neuronal. a-Esquema de una neurona. Se representa el compartimento somato-dendrítico y el compartimento axonal. Al igual que otras células eucariotas, las neuronas tienen un citoesqueleto que consta de tres polímeros principales: los microtúbulos (verde), los filamentos intermedios (púrpura) y los filamentos de actina (rojo). b- Micrografía de fluorescencia mostrando el crecimiento del cono axonal, el cual migra en respuesta a señales químicas durante el desarrollo del Sistema Nervioso. Pueden verse a los microtúbulos (verde) proyectados desde el axón y las redes de filamentos de actina (rojo) formando estructuras en forma de láminas y protuberancias filopodiales en el borde en crecimiento. Barra de escala, $20\ \mu\text{m}$. c- El axón neuronal es una larga extensión limitada por membrana, en la que los neurofilamentos (una clase de filamento intermedio en las neuronas) forman una matriz estructural que incorpora microtúbulos, que transportan materiales desde el soma hacia las terminales sinápticas. d- El cono axonal contiene redes de actina filamentosas. e- Los microtúbulos consisten en 13 protofilamentos de dímeros de tubulina dispuestos en un tubo hueco. f- Los neurofilamentos presentan proyecciones flexibles que repelen a los neurofilamentos vecinos y determinan el radio del axón. g- Los filamentos de actina están dispuestos en redes. Estas redes pueden tener muchas arquitecturas, incluidas las estructuras ramificadas representadas aquí, que están formadas por el complejo Arp2/3 (azul).

Los diagramas en e, f y g se dibujan aproximadamente a escala. Adaptado de Fletcher y Mullins. Nature, 2010.

En particular, en el presente trabajo, nos vamos a enfocar en el citoesqueleto de actina. En las neuronas, el citoesqueleto de actina desempeña un papel importantísimo en el desarrollo de la morfología de las células y en los cambios estructurales de las neuronas adultas. Así, la actina tiene un papel clave en los procesos de formación, crecimiento, guía y ramificación del axón; en la morfogénesis de las dendritas y las espinas dendríticas; en la formación y estabilidad de sinapsis; y en la retracción de axones y dendritas (revisado en Luo et al., 2002).

1.2 Actina como componente del citoesqueleto neuronal

La actina es la molécula más abundante de las células eucariotas, presentando tres isoformas posibles cada una de ellas codificada por un gen diferente (revisado en Dominguez y Holmes, 2011). Solo dos isoformas (β y γ) se encuentran en neuronas, siendo la isoforma β la que más se ha estudiado en los procesos neuronales (revisado en Cheever y Ervasti, 2013). De las tres proteínas que integran el citoesqueleto celular se considera a la actina como el componente más dinámico, capaz de realizar grandes cambios estructurales en una escala temporal de minutos, determinando de esta manera la morfología celular (revisado en Hohmann y Dehghani, 2019). El componente fundamental de este citoesqueleto es la actina, una proteína monomérica globular (actina G) con actividad de ATPasa y capacidad de autoensamblado. En condiciones fisiológicas, los monómeros de actina se polimerizan espontáneamente formando estructuras helicoidales asimétricas conocidas como filamentos de actina (actina F). Estos filamentos, caracterizados por ser delgados y flexibles, tienen un diámetro de aproximadamente 7nm (Spudich et al., 1972). La polimerización comienza lentamente, porque los pequeños oligómeros son muy inestables. La cinética de nucleación está limitada principalmente por la generación de dímeros y trímeros (Sept et al., 1999). Una vez alcanzado el estado trímero, la polimerización de los filamentos aumenta rápidamente, pero dependiendo del grupo de actina G disponible (revisado en Pollard, 2016).

La actina G está polarizada, por lo tanto, la actina F también está polarizada, con el extremo menos dinámico denominado extremo “menos” (-) y con el extremo más dinámico denominado extremo “más” (+). La adición reversible de monómeros ocurre

en ambos extremos, pero el extremo “+” se alarga de cinco a diez veces más rápido que el extremo “-” (Pollard y Mooseker, 1981). Como la actina tiene actividad de ATPasa, los extremos “+” y “-” también se pueden distinguir por su estado ATP/ADP. Así, el extremo “+” contiene mayores cantidades de actina unida a ATP, mientras que el extremo “-” contiene más actina unida a ADP (revisado en Hohmann y Dehghani, 2019). La formación de los filamentos de actina comienza cuando la actina G se une a un nucleótido de adenina (ATP) (Figura 12). Posteriormente, forma dímeros o trímeros estables y finalmente actina F, la cual se alarga mediante la adición de monómeros. Poco después de ensamblarse en el filamento, la actina hidroliza el fosfato terminal del ATP unido y disocia el fosfato. Los cambios sutiles en la estructura de las subunidades de actina asociadas con esta reacción química preparan a la actina unida a ADP para su desacople del filamento mediante proteínas reguladoras (revisado en Pollard y Cooper, 2009).

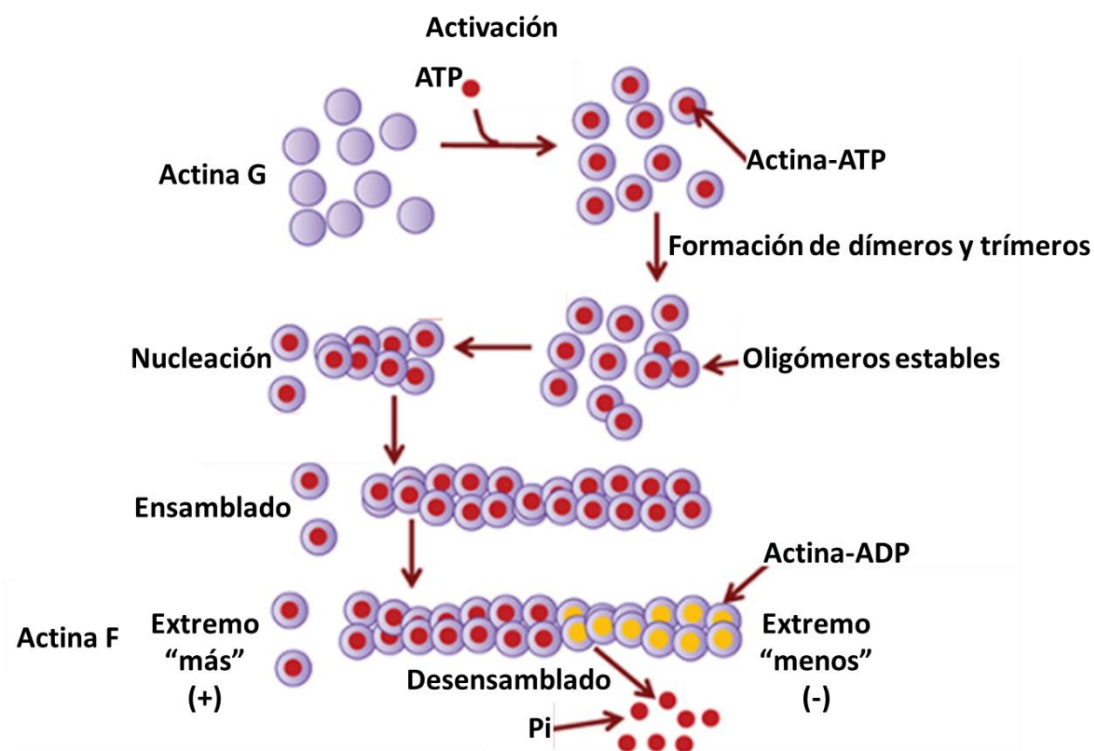


Figura 12 Esquema de formación de filamentos de actina. Primero, la actina G se une al ATP. Posteriormente, forma dímeros o trímeros estables y finalmente actina F, la cual se alarga mediante la adición de monómeros. Poco después de ensamblarse en el filamento, la actina hidroliza el fosfato terminal del ATP unido y disocia el fosfato. Los cambios sutiles en la estructura de las subunidades de actina asociadas con esta reacción química preparan a la actina unida a ADP para su desacople del filamento. La hidrólisis de ATP a ADP conduce a una distinción entre el extremo de crecimiento rápido (extremo “más”) y el extremo de crecimiento más lento o de disociación (extremo “menos”). Adaptado y modificado de Hohmann y Dehghani. Cells, 2019.

1.3 Proteínas de unión a actina (ABP)

Las células eucariotas usan más de 100 proteínas accesorias o proteínas de unión a actina (ABP por sus siglas en inglés, *actin binding protein*) que regulan prácticamente todos los aspectos del ensamblaje de actina (Figura 13). Colectivamente, las ABP mantienen un gran conjunto de monómeros de actina disponibles para iniciar la polimerización, regulan la nucleación de los oligómeros de actina, promueven el alargamiento de los filamentos, restringen la longitud de los filamentos y entrecruzan los filamentos dando lugar a estructuras de orden superior, formando haces o redes tridimensionales (Figura 13) (revisado en Pollard, 2016; Svitkina, 2018). Cabe destacar que los haces y las redes de filamentos de actina son necesarios para la formación de las estructuras subcelulares que gobiernan el movimiento celular (filopodios y lamelipodios) o que aseguran la estabilidad mecánica y la contractibilidad celular (fibras de estrés) (revisado en Hohmann y Dehghani, 2019).

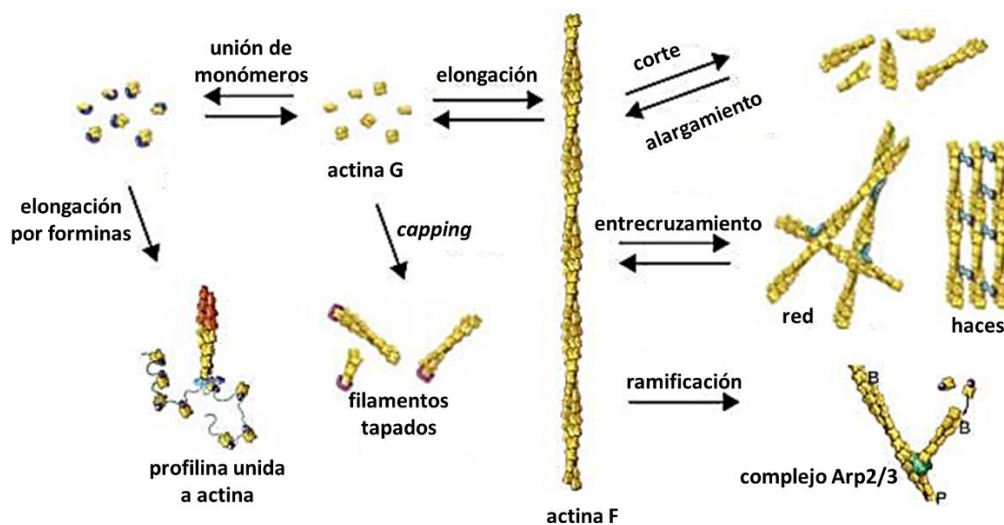


Figura 13 Descripción general de las distintas de proteínas de unión a la actina.

Se incluyen las ABP que unen monómeros de actina G, polimerasas como las forminas, las proteínas que protegen los filamentos (*capping*), las proteínas que cortan/alargan los filamentos, las proteínas que forman haces y redes y, el complejo de proteínas de ramificación Arp2/3. Adaptado de Pollard. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016.

La mayoría de las proteínas de unión a la actina tienen mecanismos de acción sutiles que contribuyen a la regulación dinámica del polímero de actina en las células (revisado en Pollard, 2016). A continuación, se describirá brevemente a las dos ABP que analizamos en la presente Tesis.

1.3.1 ABP en la regulación de la extensión de actina F: ADF/Cofilina

La familia de proteínas ADF/Cofilina (ADF por las siglas en inglés, *actin depolymerizing factor*) está compuesta por tres moléculas globulares y pequeñas: ADF, Cofilina 1 y Cofilina 2. Los miembros de esta familia son reguladores esenciales de la dinámica y función de la actina (revisado en Bamburg et al., 2021; Namme et al., 2021). Están codificadas por genes distintos, pero comparten entre el 70 y el 80% de su secuencia aminoacídica (revisado en Maciver y Hussey, 2002). La isoforma Cofilina 1 es la más abundante en neuronas de mamíferos (Garvalov et al., 2007), por lo que, a lo largo de este trabajo nos referiremos únicamente a esta isoforma como Cofilina.

En el Sistema Nervioso, Cofilina participa en la regulación de la dinámica de actina en diversos procesos neuronales como el control de la plasticidad sináptica, la apoptosis de las neuronas y la neuroinflamación (revisado en Kovaleva et al., 2019). La Cofilina se une tanto a la actina globular (G) como a la actina filamentosa (F) con una fuerte preferencia (> 40 veces) para unirse a la actina-ADP (en el extremo “-”) y, generalmente tiene un efecto desestabilizador sobre los filamentos (Ressad et al., 1998; Chen et al., 2004). La unión de Cofilina a los filamentos de actina reduce la estabilidad de las ramificaciones de actina (Chan et al., 2009). La función de esta proteína depende de su concentración (Figura I4). Los filamentos saturados con Cofilina son muy estables (revisado en Pollard, 2016), mientras que la unión de un pequeño número de cofilinas al filamento promueve el acortamiento, la despolimerización de los filamentos y bloquea el alargamiento del extremo “+” (Andrianantoandro y Pollard, 2006; De La Cruz, 2009).

La actividad de Cofilina es inhibida por la fosforilación de su aminoácido serina en la posición número 3 (S3), regulación que ejerce la quinasa de dominio LIM (LIMK) (revisado en Scott y Olson, 2007). Esta modificación postraducciona inhibe su actividad al disminuir radicalmente su afinidad a la actina (revisado en Wang y Townes-Anderson, 2016); y de esta manera, LIMK atenúa la actividad de corte y despolimerización de la Cofilina (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998; Maekawa et al., 1999). En el sentido opuesto, la desfosforilación de Cofilina en la serina 3 produce un aumento en su actividad (Morgan et al., 1993). Esta regulación la ejercen las fosfatasas de la familia Slingshot (SSH) (Niwa et al., 2002). Se ha propuesto que SSH tiene la capacidad, no sólo de activar a Cofilina a través de su desfosforilación, sino de interactuar con LIMK,

inhibiendo su actividad. Así, se formaría un complejo fosfo-regulatorio compuesto, entre otras moléculas, por LIMK y SSH, que modularía la actividad de Cofilina de manera unificada (Soosairajah et al., 2005) (Figura I4). La fosforregulación de Cofilina es un punto de convergencia clave de las redes de señalización celular que vinculan los estímulos extracelulares con la dinámica del citoesqueleto de actina. El control espaciotemporal de la actividad de Cofilina por parte de LIMK y SSH desempeña un papel crucial en diversos procesos celulares y fisiológicos (revisado en Mizuno, 2013). Se ha propuesto que las perturbaciones en el control de la actividad de Cofilina subyacen a trastornos neurodegenerativos y psiquiátricos, incluidas las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esquizofrenia (revisado en Namme et al., 2021).

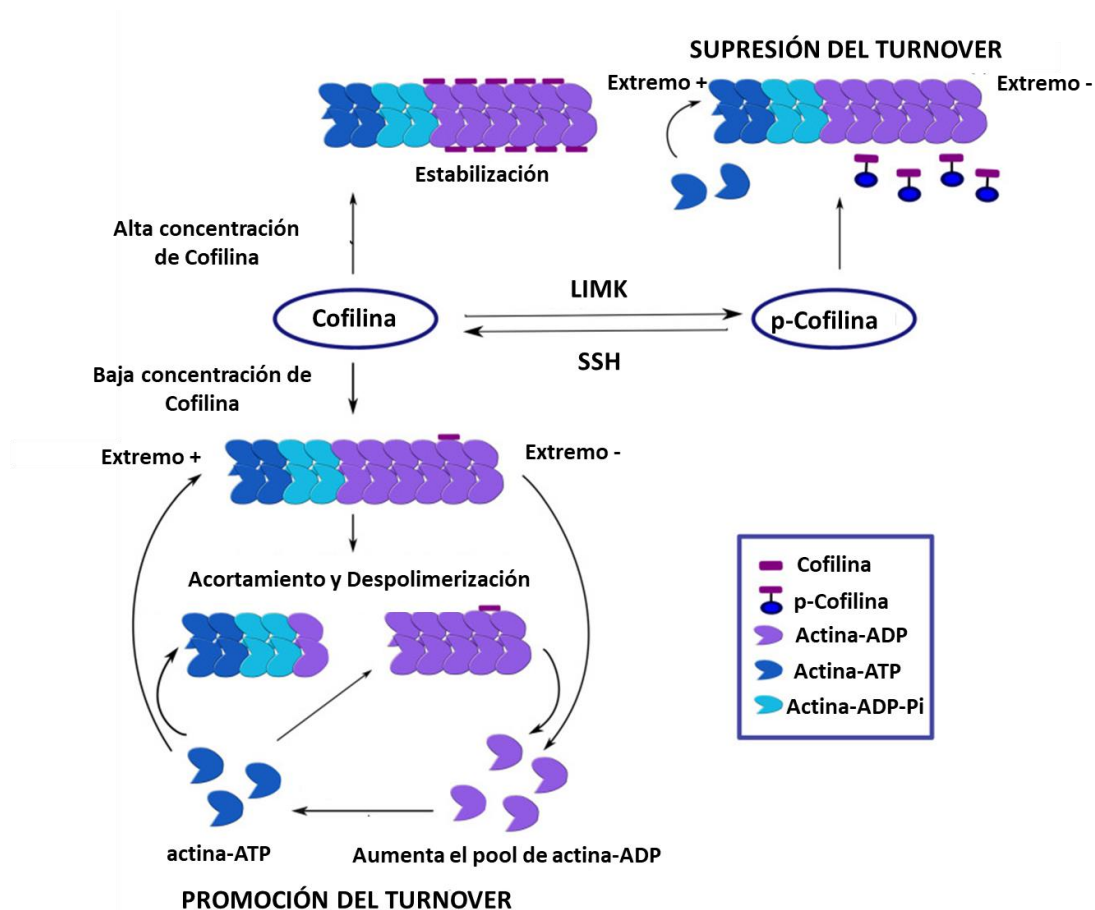


Figura I4 Regulación de la dinámica de actina por Cofilina. En proporciones bajas de Cofilina/actina, la Cofilina corta la actina F y aumenta la tasa de disociación del monómero actina-ADP. A proporciones altas de Cofilina/actina, la Cofilina estabiliza la actina F donde todas las subunidades han sufrido una rotación inducida por la Cofilina. LIMK fosforila (inactiva) a Cofilina, p-Cofilina no se une significativamente a la actina F, y la despolimerización o corte de la actina F es baja. Mientras que la fosfatasa SSH desfosforila (activa) a Cofilina. Adaptado de Namme et al. J. Mol. Sci., 2021.

1.3.2 ABP en la ramificación de actina F: complejo Arp2/3

La ramificación de actina F comienza con la creación de un núcleo inicial de actina en un filamento existente. En este proceso, el complejo Arp2/3 es considerado el nucleador clave de las ramas de actina. Este complejo está compuesto por siete subunidades: las proteínas relacionadas con la actina Arp2 (44 kDa) y Arp3 (47 kDa) y cinco subunidades más (Arpc1, Arpc2, Arpc3, Arpc4 y Arpc5) (Rouiller et al., 2008). El complejo es intrínsecamente inactivo porque las subunidades Arpc1-Arpc5 mantienen a las dos subunidades Arp separadas (Robinson et al., 2001). En el proceso de ramificación de actina F (Figura 15), el complejo Arp2/3 se une primero a un factor promotor de nucleación (NPF por las siglas en inglés, *nucleation-promoting factor*) y luego a un filamento de actina madre. Cabe destacar que, además de la acción de los NPFs, es condición necesaria la fosforilación de Arp2 para que se produzcan los cambios conformacionales que van a permitir la activación del complejo Arp2/3 (LeClaire L. L. 3rd et al., 2008; Narayanan et al., 2011). Una vez que este complejo Arp2/3 está activo, cambia su conformación, permitiendo que las subunidades Arp2 y Arp3 imiten el extremo “+” de los filamentos de actina, proporcionando la plantilla para ensamblar un nuevo filamento (Rouiller et al., 2008). En esta etapa, el NPF ayuda a agregar las dos primeras subunidades de actina a la nueva rama. Finalmente, el NPF se disocia de la nueva rama y se agregan más monómeros de actina al extremo “+” del filamento hijo (Marchand et al., 2001; Goley et al., 2010; Padrick et al., 2011; Smith et al., 2013).

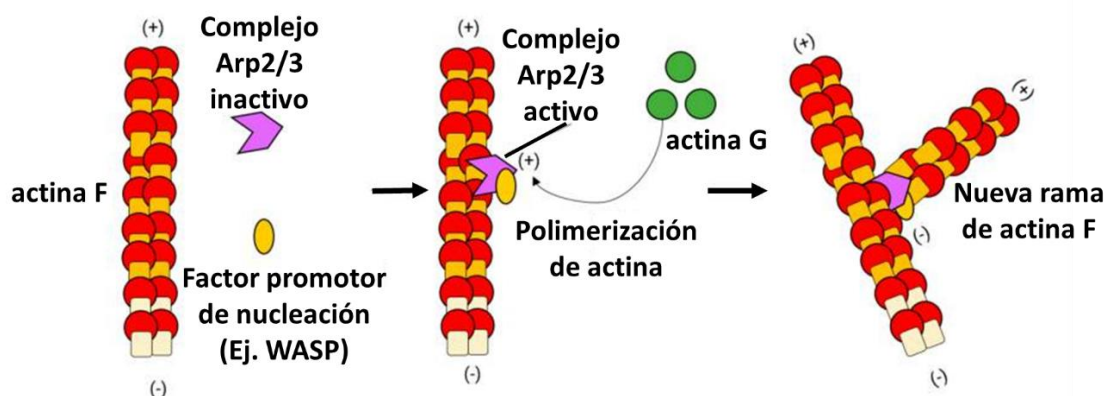


Figura 15 Proceso de ramificación de los filamentos de actina por el complejo Arp2/3.

El complejo Arp2/3 se une a un filamento de actina preformado en presencia de una proteína activadora (factor promotor de la nucleación, NPF) cerca del extremo positivo del filamento de actina y luego inicia la formación de las ramas. Adaptado de Muñoz-Lasso et al. Cells, 2020.

Con respecto a los NPF hay cinco familias de proteínas. Dentro de éstas, las que se encuentran mejor caracterizadas son las proteínas WASP (WASP y N-WASP) y las isoformas homólogas de verprolina de la familia WASP (WAVE1 – WAVE3) (revisado en Alekhina et al., 2017). Las proteínas WASP son necesarias para activar el complejo Arp2/3 durante varias etapas del desarrollo cerebral; en particular, para desarrollar y mantener las espinas y las sinapsis dendríticas (revisado en Yasuda y Nakahata, 2018). Además de los NPF, existen otras proteínas que se unen al complejo Arp2/3 y lo activan como, por ejemplo, la Cortactina (Urano et al., 2001). En el Sistema Nervioso está reportado que en la vía de señalización del citoesqueleto de actina la disfunción en la actividad del complejo Arp2/3 podría contribuir a la etiología de trastornos psiquiátricos complejos (Kim et al., 2013).

2- RHO GTPasa RAC1

2.1 Familia de Rho GTPasas en el Sistema Nervioso

Las GTPasas de la familia de Rho (homólogo de Ras) pertenecen a la superfamilia Ras y comprenden más de 20 miembros. Son pequeñas proteínas, de 20-30KDa, que unen e hidrolizan GTP. Las Rho GTPasas regulan y coordinan la remodelación del citoesqueleto de actina, participando en diversos procesos biológicos durante el desarrollo del Sistema Nervioso, la diferenciación neuronal, la supervivencia y la regeneración celular (revisado en Kalpachidou et al., 2019). Las tres Rho GTPasas canónicas incluyen a RhoA (miembro A de la familia homóloga Ras), Rac1 (sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionado con Ras) y Cdc42 (proteína 42 del ciclo de división celular). Las funciones de estas tres Rho GTPasas pequeñas están muy bien caracterizadas, todas ellas promueven la reorganización del citoesqueleto de actina. RhoA regula la formación de fibras de estrés y la contracción celular, mientras que Rac1 y Cdc42 inducen la extensión de protrusiones que incluyen la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente (revisado en Gonzalez-Billault et al., 2012).

2.2 Las Rho GTPasas presentan actividad cíclica regulada por GEFs, GAPs y GDIs

Las GTPasas de la familia Rho funcionan como interruptores moleculares, que cambian entre un estado activo (unido a GTP) predominantemente asociado a la membrana y un

estado inactivo (unido a GDP) que está presente en el citoplasma (Figura I6). La unión a GTP induce un cambio conformacional en las Rho GTPasas que promueve su interacción con muchas moléculas efectoras que controlan las vías de señalización que regulan la remodelación del citoesqueleto de actina. La regulación temporal y espacial de la actividad GTPasa es un elemento importante en el control de las vías de señalización de las Rho GTPasas. Esta regulación ocurre en tres niveles diferentes: intercambio de GDP-GTP, hidrólisis de GTP e inhibición de la disociación de GDP (ver Figura I6) (revisado en Iden y Collard, 2008).

Las Rho GTPasas pueden activarse mediante diversas señales extracelulares que impactan sobre los receptores de la membrana plasmática, como los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), los receptores de la familia de tirosina quinasa (RTK), los receptores ionotrópicos y las integrinas, entre otros. Estos receptores activan a las Rho GTPasas a través de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) (Figura I6) que se encuentran en su cercanía (revisado en Kalpachidou et al., 2019). Los GEF tienen varios dominios de interacción y determinan la señalización río abajo de las Rho GTPasas. Así, las interacciones específicas de los GEF con otras proteínas citoplasmáticas o proteínas asociadas a la membrana combinan la actividad de la RhoGTPasa-GEF a rutas de señalización específicas (revisado en Mertens et al., 2003). Por ejemplo, el GEF Tiam1 se une a la proteína Par3 (proteína clave en la polarización celular) y de ese modo conecta la actividad de la Rho GTPasa Rac1 a la vía de señalización de polarización (Chen y Macara, 2005; Mertens et al., 2005; Nishimura et al., 2005).

La inactivación de las Rho GTPasas está mediada por proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP), que refuerzan la actividad de hidrólisis de GTP intrínseca de las GTPasas, lo que resulta en el apagado de la señal (Figura I6). Al igual que con los GEF, la mayoría de las GAP son proteínas multidominio que pueden formar complejos multiproteicos (revisado en Iden y Collard, 2008).

Finalmente, los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI) secuestran y mantienen inactivas a las GTPasas en el citosol (Figura I6). Las GDI enmascaran los motivos C-terminales de las Rho GTPasas, que son necesarios para el anclaje a fosfolípidos de la membrana plasmática, evitando así la translocación de las Rho GTPasas a la membrana celular e inhibiendo su activación (revisado en Iden y Collard,

2008). Está reportado que la unión de una GDI a una Rho GTPasa promueve la estabilidad de la GTPasa y previene su degradación (Giang Ho et al., 2008; Boulter et al., 2010).

En las células, las respuestas de señalización de las Rho GTPasas están altamente localizadas (revisado en Pertz, 2010) y se han observado en distintos compartimentos subcelulares (Benink y Bement, 2005; Machacek et al., 2009; Bravo-Cordero et al., 2011; Fritz et al., 2013; Graessl et al., 2017), con varias GTPasas actuando simultáneamente. Por lo tanto, la morfogénesis celular implica la acción coordinada de múltiples miembros de la familia de las Rho GTPasas y sus reguladores, los cuales en su conjunto forman redes complejas (revisado en Guilluy et al., 2011; Devreotes y Horwitz, 2015).

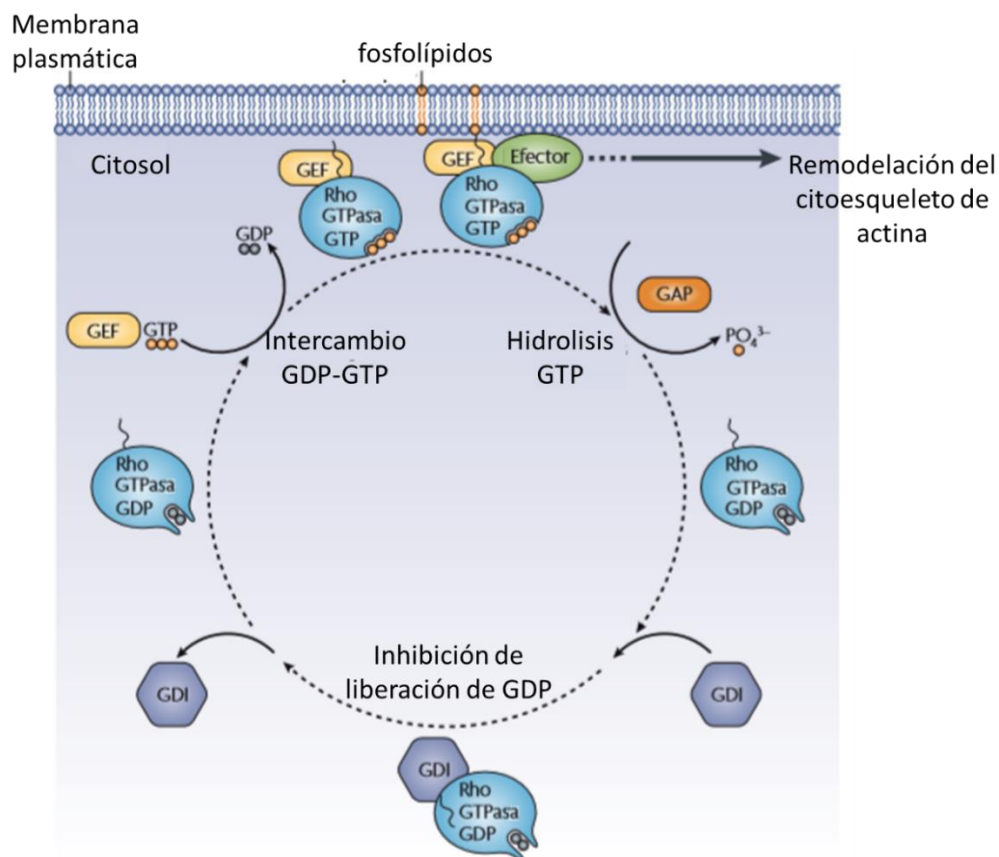


Figura 16 Mecanismos de activación/inactivación de las Rho GTPasas canónicas.

La actividad de las Rho GTPasas está modulada por su localización subcelular. Las Rho GTPasas funcionan como interruptores moleculares, que cambian entre un estado activo (unido a GTP) predominantemente asociado a la membrana, y un estado inactivo (unido a GDP) que está presente en el citoplasma. El cambio de los estados activo e inactivo depende de la actividad de las proteínas GEF (amarillo) y GAP (naranja), respectivamente. En la forma activa, las Rho GTPasas pueden interactuar con las proteínas/moléculas efectoras que inician una respuesta específica, que implica la remodelación del citoesqueleto de actina, río abajo de la cascada de señalización. El tercer mecanismo general que contribuye a la regulación de las Rho GTPasas depende de las proteínas GDI (violeta) que reconocen y se unen a la región C-terminal de las Rho GTPasas, inhibiendo así su translocación a la membrana plasmática. Esquema adaptado de Iden y Collard. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2008.

En mamíferos, se han identificado 20 miembros de la familia de las Rho GTPasas y numerosos reguladores de su actividad: 70 RhoGEF, 80 RhoGAP y 3 RhoGDI (revisado en Schaefer et al., 2014). Nótese que las proteínas multidominio RhoGEF y RhoGAP superan ampliamente en número a las proteínas Rho GTPasas que regulan, dando como resultado especificidad a las vías de señalización (Müller et al., 2020). Algunos RhoGEF tienen especificidad por una sola Rho GTPasa, mientras que otros pueden activar múltiples Rho GTPasas (revisado en Iden y Collard, 2008). Las RhoGAP tienen menos dominios de interacción que las RhoGEF, son menos selectivas para regular la actividad de las Rho GTPasas y, por lo tanto, poseen potencialmente una regulación más autónoma (Müller et al., 2020).

Por otro lado, las RhoGEF y RhoGAP actúan como intermediarios en la asociación de las Rho GTPasas a estructuras celulares y moléculas efectoras específicas, contextualizando y delimitando espacialmente el flujo de difusión de las Rho GTPasas. Esto explica por qué la misma Rho GTPasa puede ejercer múltiples funciones, dependiendo de la localización subcelular y del contexto celular (Müller et al., 2020). Algunos reguladores de las Rho GTPasas muestran restricción a ciertos tejidos o etapas de desarrollo, y su actividad está regulada por interacciones proteína-proteína y modificaciones postraduccionales (revisado en Iden y Collard, 2008). La mayoría de estas proteínas reguladoras presentan autoinhibición y responden a las señales locales, un mecanismo que limita aún más su actividad espacial y permite una rápida adaptación frente a los cambios del contexto celular (Müller et al., 2020).

Finalmente, cabe destacar que, se ha estudiado un gran número de reguladores de la actividad de las Rho GTPasas en sistemas no neuronales, pero nuestra comprensión de sus funciones específicas en neuronas no es tan avanzada (revisado en Niftullayev y Lamarche-Vane, 2019).

2.3 Las Rho GTPasas actúan como nodos de señalización

Las Rho GTPasas regulan muchos procesos celulares esenciales, incluida la remodelación del citoesqueleto de la actina, la progresión del ciclo celular, la transcripción génica y la adhesión celular (revisado en Bishop y Hall, 2000). Estas pequeñas proteínas actúan como nodos de señalización, integrando las señales provenientes de los receptores de

la membrana plasmática (que recibieron estímulos extracelulares) y posteriormente, modificando la función de las proteínas efectoras (Figura 17) (revisado en Lowery y Van Vactor, 2009). Las Rho GTPasas, en la conformación unida a GTP, interactúan físicamente y controlan la actividad de múltiples proteínas efectoras que inician una respuesta específica río abajo de la cascada de señalización (revisado en Bishop y Hall, 2000). En particular, cuando la activación o inactivación de las proteínas efectoras conduce a la remodelación del citoesqueleto de actina se induce, por ejemplo, la polimerización de actina F a fibras lineales o redes ramificadas (Ver Figura 17) (revisado en Lowery y Van Vactor, 2009).

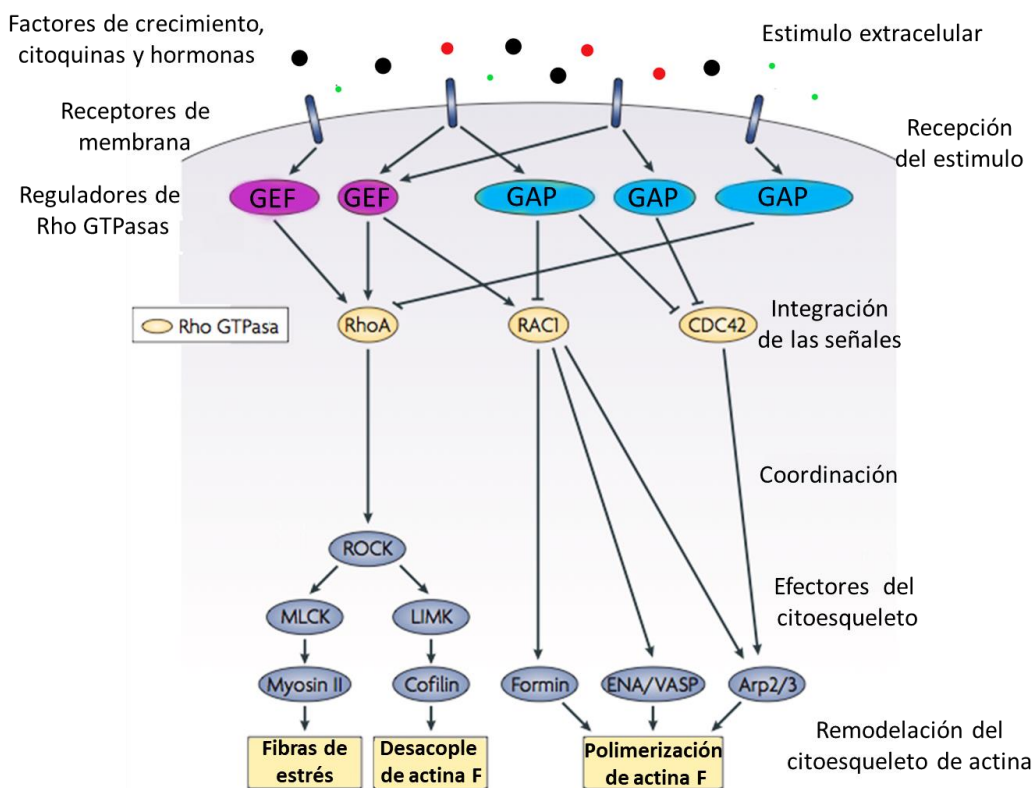


Figura 17 Las Rho GTPasas actúan como nodos en las vías de señalización integrando señales direccionadas río arriba y coordinando la remodelación del citoesqueleto río abajo.

Los estímulos extracelulares impactan en los receptores de la membrana plasmática y producen señales que conducen a la activación de los reguladores de las Rho-GTPasas. Estos reguladores incluyen, las proteínas que activan las GTPasas, factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) y las que los inactivan, proteínas activadoras de GTPasa (GAP). Las Rho-GTPasas integran las respuestas provenientes de los receptores de membrana y coordinan la función de los efectores del citoesqueleto. La activación o inactivación de efectores del citoesqueleto conduce a respuestas tales como la formación de fibras de estrés, el desensamblaje de actina F o la polimerización de actina F.

En esta figura se muestran algunos ejemplos de efectores del citoesqueleto: proteína relacionada con la actina (Arp) 2/3, fosfoproteína activada / estimulada por vasolidador (Ena / VASP), quinasa de dominio LIM (LIMK), quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) y quinasa Rho (ROCK).

Esquema adaptado de Lowery y Van Vactor. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009.

2.4 Crosstalk entre Rho GTPasas

Muchos procesos fundamentales de la biología celular están regulados por las Rho GTPasas, incluidos la adhesión celular, la migración y la diferenciación. Durante la regulación de estos procesos celulares, los miembros de la familia de las Rho GTPasas cooperan o antagonizan entre sí dando como resultado una red molecular que exhibe muchos niveles de interacción regulados dinámicamente en lugares y tiempos específicos dentro de las células (revisado en Guilluy et al., 2011).

Los principales mecanismos de estas interacciones cruzadas pueden ocurrir en tres niveles diferentes de la vía de señalización (Figura I8):

1- A través de la regulación de la actividad: cuando una Rho GTPasa modula la actividad y/o localización de un GEF o un GAP de otra Rho GTPasa.

2- A través de la unión competitiva a una Rho GDI: solo hay tres tipos de Rho GDIs y la unión de una GDI a una Rho GTPasa promueve la estabilidad de la GTPasa y previene su degradación.

3- Mediante la regulación de las vías de señalización río abajo: cuando dos (o más) Rho GTPasas regulan a la misma proteína efectora.

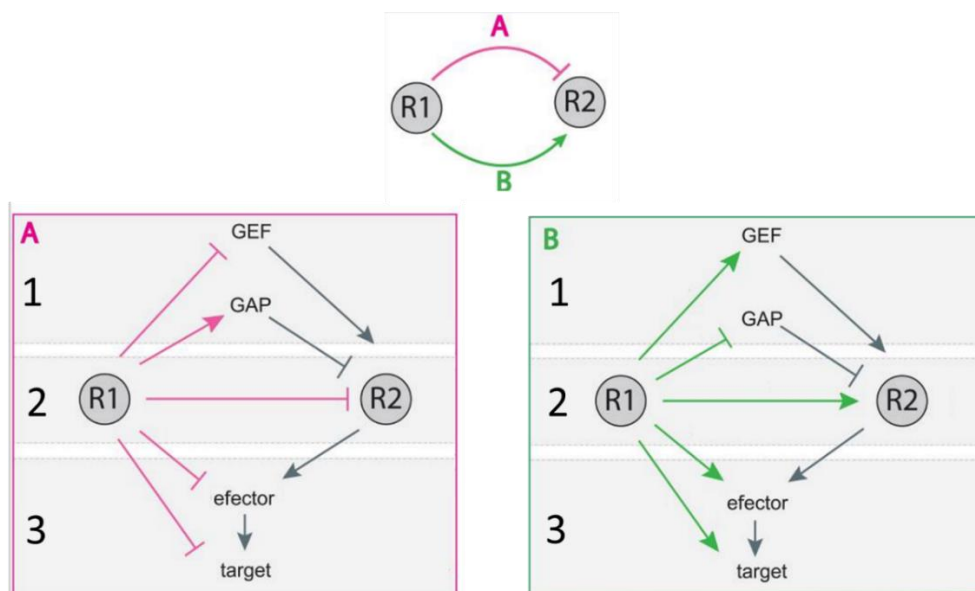


Figura I8: Mecanismos moleculares de *crosstalk* entre las Rho GTPasas

Se ilustran diferentes modos de interacción entre Rho GTPasas (R1=Rho GTPasa tipo 1 ≠ R2=Rho GTPasa tipo 2), las cuales pueden ser antagónicas (A) o cooperativas (B). Hay tres niveles principales en los que los miembros de la familia Rho interactúan: (1) regulación de la actividad (a través de un GEF o un GAP); (2) regulación de la expresión y estabilidad de la proteína (competencia unión a una RhoGDI); y (3) regulación de las vías de señalización río abajo. Adaptado de Guilluy et al. Trends Cell Bio., 2011.

Para destacar la importancia de estos mecanismos de “*crosstalk*” entre las Rho GTPasas en distintos procesos neuronales se mencionarán dos ejemplos:

Esta reportado que las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 actúan sinérgicamente sobre la Cofilina y controlan la estabilidad del filamento de actina. Esto lo logran mediante la activación del efector LIMK quien fosforila e inactiva a la Cofilina. Este *crosstalk* entre RhoA, Rac1 y Cdc42 juega un papel central durante el crecimiento neuronal (revisado en Kuhn et al., 2000).

Durante el proceso de axogénesis Rac1 se activa río abajo de Cdc42, como consecuencia de la interacción de Cdc42 con proteínas de polaridad (PAR) y con Tiam1 (GEF de Rac1). De este modo, la señalización del complejo Cdc42-PAR está acoplada a la activación de Rac1 durante el desarrollo del axón (revisado en Iden y Collard, 2008).

2.5 Las Rho GTPasas regulan la actividad de proteínas efectoras

La mayoría de las proteínas efectoras contienen dominios autoinhibitorios que, mediante interacciones intramoleculares, mantienen a la proteína en una conformación inactiva. Las Rho GTPasas canónicas Rho, Rac1 y Cdc42 activan a sus efectores empleando un mecanismo común. Tras la unión de la Rho GTPasa a su efector, la secuencia inhibidora del efector se desplaza, exponiendo así los dominios funcionales de la proteína efectora (Figura 19) (revisado en Bishop y Hall, 2000; Riento y Ridley, 2003).

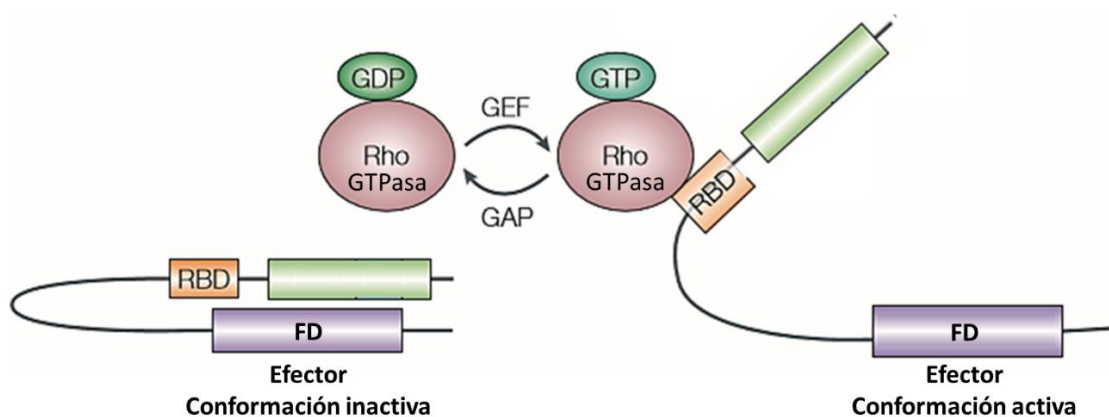


Figura 19 Mecanismo de activación de los efectores de las Rho GTPasas canónicas Rho, Rac1 y Cdc42. Los efectores poseen dominios inhibidores, dentro de los cuales se encuentra el dominio de unión a la Rho GTPasa (RBD). Tras la unión de la Rho GTPasa a su efector, la secuencia inhibidora del efector se desplaza, exponiendo así los dominios funcionales (FD) de la proteína efectora. Esquema modificado de Riento y Ridley. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003.

El mecanismo por el cual las Rho GTPasas activan a sus efectores se cumple para numerosas proteínas, incluidas entre otras: la quinasa activada por p21 (PAK), principal efector de Rac1 y Cdc42 (Zhao y Manser, 2012) y la proteína homóloga a verprolina de la familia WASP (WAVE), efector de la subfamilia de Rac1 (revisado en Kurisu y Takenawa, 2009).

2.6 Rac1 y efectores involucrados en la formación de lamelipodios

Las Rho GTPasas canónicas median la morfología, la polaridad, el movimiento y la división celular (revisado en Hall, 1998). Una vez activadas, las GTPasas se unen a proteínas quinasas (revisado en Zhao y Manser, 2005) y a algunas proteínas de unión a actina. Estos efectores impactan directa o indirectamente en el ensamblado y el desacoplado local de la actina F (Sit y Manser, 2011) y dan lugar a la formación de estructuras subcelulares de actina (Figura I10, A) (Nobes y Hall, 1995) (revisado en Hohmann y Dehghani, 2019).

En humanos y otros mamíferos Rac presenta tres isoformas: Rac1, Rac2 y Rac3, las cuales están codificadas por distintos genes, pero comparten una alta identidad de secuencia (88–92%). Rac1 y Rac3, se expresan en neuronas, mientras que Rac2 solo se expresa en células hematopoyéticas (Didsbury et al., 1989) (revisado en de Curtis, 2008). En particular, en el presente trabajo nos enfocaremos en la Rho GTPasa Rac1, por ser la isoforma más ampliamente caracterizada (revisado en Wennerberg y Der, 2004).

La activación de la GTPasa Rac1 induce la formación de lamelipodios (Figura I10, B) (Ridley et al., 1992). El lamelipodio es una estructura dinámica asociada con el movimiento celular, que consiste principalmente en redes ramificadas de actina F (revisado en Hohmann y Dehghani, 2019). Rac1 presenta activaciones transitorias durante este proceso celular. Estas activaciones, de corta duración, garantizan un control local y rápido de las acciones de la GTPasa sobre su principal efector, el complejo regulador WAVE (WRC). El complejo WRC activa a Arp2/3 iniciando la ramificación de los filamentos de actina, proceso clave en la formación de redes ramificadas de actina F (Mehidi et al., 2019). Otro efector importante de Rac1 en la formación de lamelipodios es la proteína PAK quien inactiva a la proteína Cofilina promoviendo la estabilidad y el alargamiento de actina F (Delorme et al., 2007).

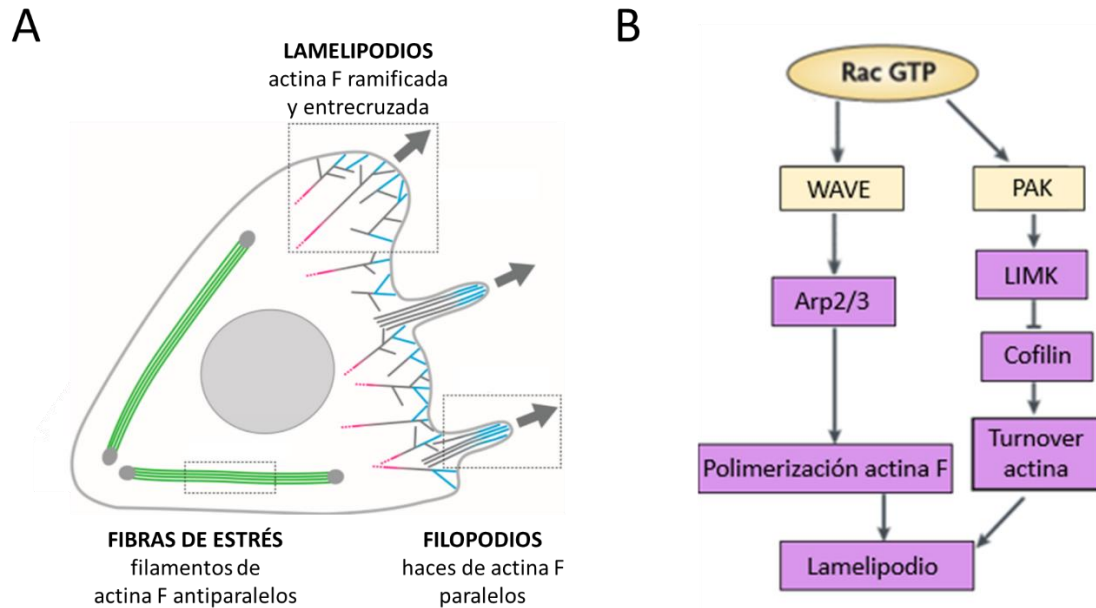


Figura I10 Las Rho GTPasas como reguladoras de la formación de estructuras subcelulares de actina.
A- Representación esquemática de las estructuras subcelulares de actina que se encuentran en la célula. Lamelipodios: red densa y ramificada de actina F involucrada en la protrusión celular. Filopodios: estructura compuesta de haces paralelos de actina F que sensa el entorno extracelular e influye en la dirección de la motilidad celular. Fibras de estrés: estructura contráctil y dinámica compuesta por haces de actina F antiparalelos y / o de polaridad mixta asociados con miosina.
B- Vía de señalización de la Rho GTPasa Rac1 implicada en la formación de lamelipodios. Panel A del esquema modificado de Tokuraku et al. Int J Mol Sci., 2020.

2.7 Rac1 y estructuras subcelulares de actina en las neuronas

El crecimiento y la migración de las neuronas requieren una remodelación continua del citoesqueleto neuronal, el cual proporciona un marco versátil para el movimiento celular además del soporte estructural. Los filamentos de actina son fundamentales para la acción dinámica del citoesqueleto y las estructuras intracelulares dinámicas que forman (Figura I11) (revisado en Coles y Bradke, 2015). La ramificación de los filamentos de actina es esencial para el desarrollo de las redes dendríticas (compuestas casi exclusivamente por actina F ramificada) (Figura I11 C) y para la función adecuada de axones y sinapsis (revisado en Muñoz-Lasso et al., 2020). Además, la ramificación de la actina F permite la construcción de estructuras celulares clave, como los lamelipodios (Figura I11 A), que son esenciales para construir estructuras móviles como el cono de crecimiento neuronal (revisado en Gomez y Letourneau, 2014). Las Rho GTPasas tienen un papel clave en el crecimiento axonal y en la ramificación dendrítica, regulando la

formación de estructuras dinámicas de actina durante estos procesos celulares (revisado en Coles y Bradke, 2015).

La plasticidad estructural de las espinas dendríticas está regulada por las proteínas Rho GTPasas (revisado en Hedrick y Yasuda, 2017). En general, Rac1 promueve la formación y la maduración de las sinapsis y de las espinas dendríticas (revisado en Tolia et al., 2011). El principal efector de este proceso neuronal es el complejo Arp2/3, que es activado por WAVE, efector de Rac1. La morfogénesis de las espinas dendríticas comienza con un parche de actina que se alarga en un filopodio dendrítico (Figura I11 B), cuya punta se expande posteriormente a través de la ramificación de actina F dependiente del complejo Arp2/3 (Figura I11 C) y cuya longitud se modula por la contractilidad dependiente de la proteína miosina II (Korobova y Svitkina, 2010).

Las Rho GTPasas tienen un papel fundamental durante los cambios morfológicos axonales (revisado en Spillane y Gallo, 2014). El cono axonal en crecimiento requiere de la formación de diferentes estructuras subcelulares de actina que están implicadas en el movimiento, el sensado del entorno extracelular y la restricción al crecimiento axonal. En particular, Rac1 promueve la formación de lamelipodios en los conos de crecimiento (Figura I11 A). Esta GTPasa recluta el complejo WAVE a la membrana plasmática permitiendo la remodelación de actina, por medio de la activación del complejo Arp2/3, necesaria para el crecimiento del axón (Tahirovic et al., 2010).

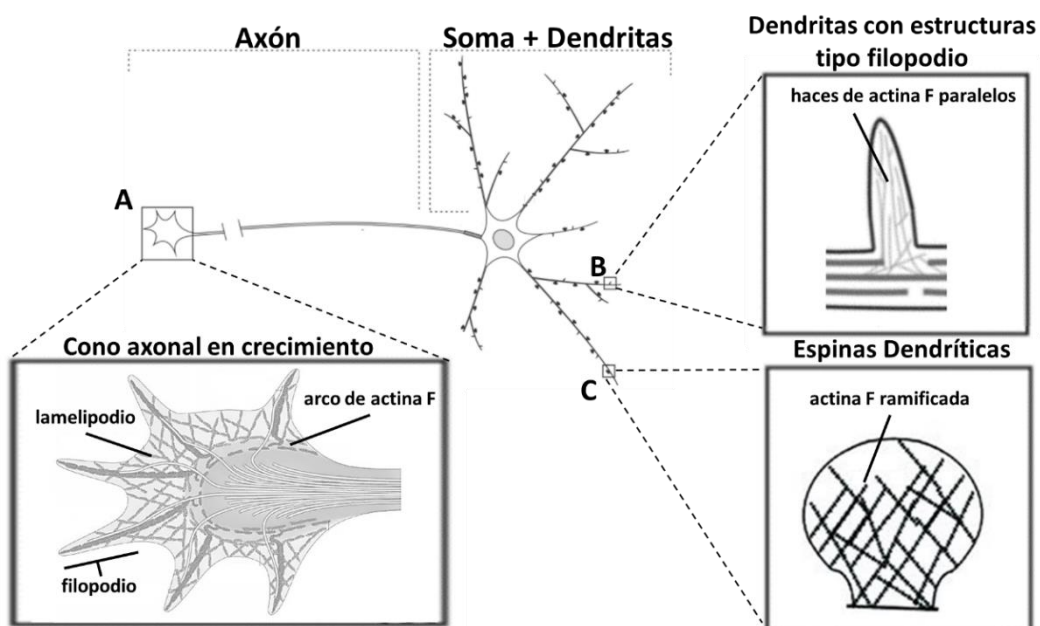


Figura I11 Esquema de las estructuras intracelulares dinámicas de actina en una neurona.

Las estructuras subcelulares características del citoesqueleto de actina se encuadran y se proporcionan vistas ampliadas. En la punta del axón, el cono de crecimiento (A), media el alargamiento axonal y guía hasta una célula blanco. Las mallas de actina ramificada unen los haces radiales de actina F y junto con la miosina II, se enriquecen en los arcos contráctiles de la zona de transición (Arco de actina F). El cono de crecimiento del axón presenta filopodios (estructura compuesta por haces paralelos de actina F) y lamelipodios (estructura formada por una red densa y ramificada de actina F). Los filamentos de actina son los componentes predominantes del citoesqueleto tanto en las estructuras dendríticas similares a filopodios (B) como en las espinas dendríticas maduras (C). Esquema modificado de Coles y Bradke. *Curr Biol.*, 2015.

2.8 Desregulación de Rac1 en Sistema Nervioso

La Rho GTPasa Rac1 es esencial en el desarrollo, crecimiento, migración y plasticidad neuronales; y su desregulación está asociada con varias enfermedades neurodegenerativas y trastornos del desarrollo neurológico, como el trastorno del espectro autista, la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer y la discapacidad intelectual (Duman et al., 2021) (revisado en Stankiewicz y Linseman, 2014; Marei y Malliri, 2017).

Por ejemplo, numerosas mutaciones implicadas en la pérdida de función de Rac1 y en otros genes de la vía de señalización de esta GTPasa estarían implicadas en la patogenia de la discapacidad intelectual (Ramakers et al, 2012; Reijnders et al., 2017; Maglorius Renkilaraj et al., 2017; Klein et al., 2017) (revisado en Lelieveld et al., 2016). En Sistema Nervioso, está ampliamente caracterizada la pérdida de función de Rac1 (Duman et al., 2021), sin embargo, el efecto de la hiperactividad de Rac1 en las redes neuronales ha sido poco estudiado.

3- PROTEÍNAS / REGIONES INTRINSECAMENTE DESORDENADAS (IDP/ IDR)

3.1 Definición de IDP/ IDR

A pesar del paradigma clásico de estructura-función (o modelo de "llave y candado") en el que la secuencia de aminoácidos de una proteína determina una estructura altamente ordenada con una única función biológica, existen muchas proteínas cuyas funciones no requieren de una estructura ordenada. Las proteínas/regiones intrínsecamente desordenadas (IDP/IDR) se refieren a las proteínas/regiones sin una estructura tridimensional estable en su estado nativo, pero que exhiben actividades biológicas (revisado en Tompa, 2012; Liu et al. 2019). Su flexibilidad móvil e inestabilidad estructural están codificadas por sus secuencias de aminoácidos, que incluyen una

proporción relativamente baja de residuos hidrofóbicos y aromáticos, y una proporción relativamente alta de residuos cargados y polares (revisado en Oldfield y Dunker, 2014; Dyson, 2016). Las IDP/IDR son abundantes en todas las especies, especialmente en eucariotas (Pancsa y Tompa, 2012) y ejecutan funciones principalmente a través de un plegamiento inducido cuando se unen a una molécula ordenada (revisado en Tompa, 2012). Están asociadas con muchas funciones biológicas como la regulación de la transcripción y la traducción, el almacenamiento de moléculas pequeñas, la transducción de señales celulares y la fosforilación de proteínas (Iakoucheva et al., 2002) (revisado en Dyson y Wright, 2005). Si bien se han dedicado grandes esfuerzos a investigar las estructuras complejas, las cinéticas y las afinidades de unión, nuestro conocimiento sobre los mecanismos de unión de las IDP/IDR sigue siendo muy limitado (revisado en Yang et al., 2019).

3.2 Características de las IDP/ IDR

Las características físicas de las IDP/ IDR permiten un control muy fino de los procesos de señalización celular. Sus características favorables incluyen: la presencia de pequeños elementos de reconocimiento que se pliegan cuando se unen a su *partner*; un grado de flexibilidad que permite la interacción promiscua con diferentes blancos en diferentes ocasiones; presentan sitios accesibles para la modificación postraduccional; poseen motivos de secuencia conservados que median en las interacciones; tienen la capacidad de unirse a *partners* con alta especificidad pero afinidad modesta, lo que lleva a una disociación y terminación rápida y espontánea de la señal (Oldfield et al., 2005) (revisado en Wright y Dyson, 1999 ; Dyson y Wright, 2005); y ventajas cinéticas en las vías de señalización ya que sus tasas de asociación extremadamente rápidas permiten que las señales se activen rápidamente (revisado en Pontius, 1993). En redes regulatorias dinámicas, las IDP/IDR pueden unirse transitoriamente a múltiples *partners*, respondiendo de manera precisa y cuantitativa a las señales celulares y, participando en el procesamiento de información compleja (revisado en Stein et al., 2009). Sus interacciones moleculares son transitorias y dinámicas: las IDP intercambian *partners* y compiten por unirse a las proteínas centrales, que a menudo están presentes en cantidades limitadas. Estas interacciones están finamente reguladas por modificaciones postraduccionales que les permiten funcionar como interruptores y reóstatos (Borg et

al., 2007; Lee et al., 2010) (revisado en Dyson y Wright, 2005; Gsponer y Babu, 2009; Van Roey et al., 2012).

3.3 IDP/IDR como centros de señalización

Debido a que las IDP y las IDR de proteínas multifuncionales grandes frecuentemente contienen múltiples motivos de interacción que median la unión a diversos blancos, comúnmente funcionan como ejes centrales en las vías de señalización (Kim et al., 2008) (revisado en Dunker et al., 2005). La capacidad de unirse a sus blancos a través de múltiples sitios confiere a las IDP propiedades específicas que facilitan el ensamblaje dinámico de complejos ternarios y de orden superior e integran diversas vías de señalización. La existencia de múltiples sitios de unión también permite respuestas alostéricas en la señalización biológica, y la energía del proceso de unión está finamente ajustada por las grandes variaciones de entropía entre los estados libre y unido (revisado en Flock et al., 2014). De este modo, las IDP/ IDR son componentes importantes de la maquinaria de señalización celular, ya que el mismo polipéptido presenta diferentes interacciones con diferentes consecuencias. Además, las IDP/ IDR están sujetas a modificaciones postraduccionales, implicadas en cambios conformacionales de las proteínas, lo que agrega complejidad a las redes reguladoras y proporciona un mecanismo para la señalización tejido-específica (revisado en Wright y Dyson, 2015).

4- FGD6

4.1 Familia de FGDs

La familia de FGDs (por sus siglas en inglés *Facio Genital Dysplasia*) está compuesta por 6 miembros (FGD1-6) y un GEF (intercambiador del nucleótido guanina) relacionado (FRG). Estructuralmente este grupo de proteínas presenta una región carboxilo terminal altamente conservada con un dominio de homología a Dbl (DH) (catalítico) seguido de un primer dominio de homología a pleckstrina (PH) (de interacción con la membrana plasmática), un dominio FYVE (de tráfico intracelular de membrana y de unión a fosfoinosítidos) y un segundo dominio PH (Figura I12) (revisado en Nakanishi y Takai, 2008). El extremo amino terminal es único para cada miembro del grupo y consiste en una región de baja complejidad rica en glutamato (revisado en Eitzen et al., 2019). Esta

estructura les permitiría actuar como nexo entre las señales provenientes de la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina (revisado en Nakanishi y Takai, 2008).

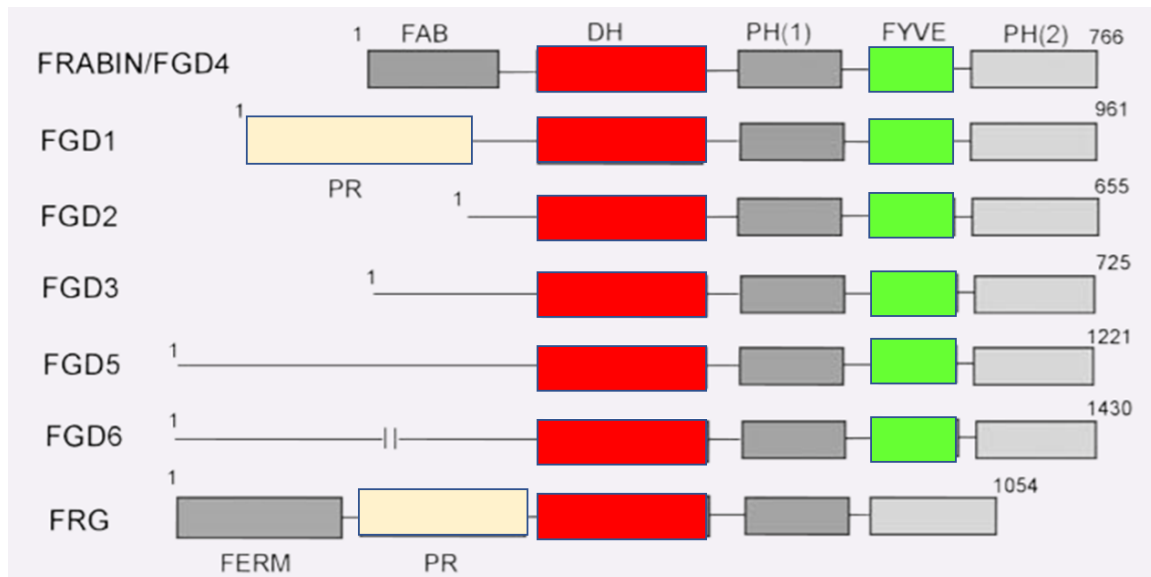


Figura 112 Esquema de los dominios estructurales de los miembros de la familia de FGDs. Se muestran los distintos dominios y su organización. DH: dominio funcional, PH (1 y 2): dominio de interacción con la membrana plasmática, FYVE: dominio implicado en el tráfico intracelular de membrana y de unión a fosfoinosítidos, PR: dominio rico en prolina, FERM: dominio de unión a fosfoinosítidos y a las colas citoplasmáticas de proteínas integrales de membrana. Adaptado de Nakanishi y Takai. *J. Cell. Mol.*, 2008.

Los dominios DH se unen a las regiones flexibles *switch* I y *switch* II del dominio efector de las Rho GTPasas, lo que induce un cambio conformacional de la GTPasa y el intercambio de nucleótidos de guanina (GDP por GTP) (revisado en Rossman et al., 2005). Se ha demostrado que los dominios PH adyacentes a los dominios DH de varios GEF se unen específicamente a proteínas G pequeñas libres de nucleótidos y ayudan a las reacciones de intercambio de nucleótidos de guanina (Rossman et al, 2002).

4.2 Localización subcelular de las proteínas FGD

Las proteínas FGD se localizan en múltiples estructuras dinámicas de actina y en la superficie de las células. Esta localización está mediada por sus múltiples dominios de unión a fosfoinosítidos (revisado en Eitzen et al., 2019). A continuación, se describe la localización subcelular específica para los distintos miembros de la familia:

FGD1 se asocia con el citoesqueleto de actina subcortical. Su región N-terminal interactúa con Cortactina y mAbp1, proteínas de unión a actina que regulan al complejo

Arp2/3 (Hou et al., 2003; Kim et al., 2004). Recientemente, se reportó que FGD1 aumenta la actividad de Cdc42 en células endoteliales humanas (Reinhard et al., 2021).

FGD2 se asocia a las membranas endosomales a través del reconocimiento de PI3P mediado por el dominio FYVE. Además, es reclutado en los lamelipodios por medio de la interacción del dominio PH2 con la membrana plasmática (Huber et al., 2008). A través de estas acciones, FGD2 podría influir en la polarización celular, la migración celular o en el proceso de micropinocitosis (revisado en Eitzen et al., 2019).

FGD3 induce la formación de lamelipodios (Hayakawa et al., 2008). Cuando se expresa la región que comprende a los dominios DH y PH1 como una construcción en tándem, se induce la formación de filopodios (Pasteris et al., 2000).

FGD4 se asocia a estructuras dinámicas de actina ubicadas en la membrana plasmática a través de su región N-terminal. Activa a Cdc42 y a Rac1 en la zona de formación de filopodios y lamelipodios, respectivamente (Kim et al., 2002).

FGD5 participa en la migración celular de células endoteliales y se localiza en los lamelipodios y otras estructuras dinámicas de actina. Además, regula la retención del receptor 2 de VEGF (VEGFR2) en el reciclado de la membrana endosomal (Farhan et al., 2017).

FGD6 se ha descrito en la membrana plasmática de los osteoclastos, donde regula la formación de podosomas a través de la activación de Cdc42 y el reciclado de la membrana endosomal (Steenblock et al., 2014).

De este modo, los miembros de la familia FGD participan en varios de los procesos fisiológicos que requieren de una remodelación dinámica de la morfología celular. La señalización celular aberrante causada por mutaciones puntuales y su regulación positiva conduce a defectos de desarrollo y progresión del cáncer (revisado en Eitzen et al., 2019).

4.3 Actividad funcional de las proteínas FGD: GEF de Rho GTPasas

Todos los GEF que contienen dominios DH-PH en tándem muestran afinidad específica por las proteínas Rho GTPasas. Esta especificidad de unión se encuentra en gran medida dentro del dominio DH (Snyder et al., 2002). Algunos RhoGEF contienen una región con

baja preferencia de unión e interactúan con numerosas proteínas Rho mientras que, otros son altamente específicos (revisado en Cook et al., 2014). Varios miembros de la familia FGD tienen función descripta de GEF (Müller et al., 2020). En particular, los miembros FGD1-3 y FRG son activadores específicos de la Rho GTPasa Cdc42 (Zheng et al., 1996; Miyamoto et al., 2003; Huber et al., 2008; Müller et al., 2020), mientras que, FGD4 activa directamente a Cdc42 (Umikawa et al., 1999) e indirectamente a Rac1 (Ono et al., 2000). Por su parte, FGD5 es un activador específico de la Rho GTPasa Rac1 (Park et al., 2021). Con respecto a FGD6, hasta el momento no se ha reportado que tenga actividad de GEF para una Rho GTPasa particular.

4.4 Patologías asociadas a mutaciones en los miembros FGD

Fallas en las vías de las proteínas Rho GTPasas han sido asociadas con cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos del desarrollo y neurológicos (Brakebusch, 2021) (revisado en Rossman et al., 2005; Strassheim et al., 2019). Comúnmente, en las distintas patologías, la actividad desregulada de las Rho GTPasas ocurre por mecanismos indirectos. Un mecanismo frecuente implica la activación aberrante de las Rho GTPasas como consecuencia de la expresión y/o la actividad desregulada de las proteínas Rho GEFs mutadas, con la consecuente alteración de las vías en las que participan (revisado en Cook et al., 2014). En Sistema Nervioso, la disfunción en las vías de señalización de las Rho GTPasas contribuye sustancialmente a la patogénesis del trastorno del espectro autista (ASD). Se han reportado 20 genes que codifican para los reguladores y efectores de Rho GTPasas como genes de riesgo de ASD (revisado en Guo et al., 2020).

Dado que varios de los miembros de la familia de FGD tienen función de Rho GEF, siendo mediadores clave de la activación de las Rho GTPasas Rac1 y Cdc42, no es sorprendente que mutaciones en estas proteínas estén asociadas a una desregulación de sus Rho GTPasas blanco. La expresión de FGD1 está restringida al tejido esquelético y se ha descrito su participación en el desarrollo del esqueleto ya que mutaciones en este gen producen displasia faciogenital (síndrome de Aarskog-Scott), un desorden del desarrollo ligado al cromosoma X (Aarskog, 1971; Scott, 1971; Pasteris et al. 1994). Las mutaciones en FGD1, asociadas a este síndrome, causan pérdida de la función GEF (Genot et al., 2012). FGD1 promueve la migración celular probablemente mediante la inducción de la

formación de podosomas y la remodelación de la matriz extracelular (Daubon et al., 2011; Oshima et al., 2011). La formación de podosomas por osteoclastos es importante para la correcta formación y resorción ósea (revisado en Kylmaoja et al., 2016). FGD4 presenta expresión ubicua y mutaciones en este gen están asociadas a un subtipo de la neuropatía progresiva Charcot-Marie–Tooth. Las mutaciones reportadas se encuentran dentro del dominio funcional DH, responsable de la activación de Cdc42, lo cual sugiere que se está afectando o impidiendo la activación de esta GTPasa (Delague et al., 2007; Boubaker et al., 2013; Hyun et al., 2015).

No se han encontrado mutaciones asociadas a enfermedad para los miembros FGD2, FGD3 ni FGD5. Sin embargo, las funciones emergentes para las proteínas FGD como Rho GEF que regulan la actividad de las Rho GTPasas en los procesos celulares están comenzando a definirse. FGD2 se expresa en linfocitos B, macrófagos y células dendríticas y, está asociado a endosomas tempranos y a lamelipodios, lo que sugiere múltiples vías posibles para la regulación de la actividad y la función celular (Huber et al. 2008). FGD3 se expresa predominantemente en músculo esquelético (Pasteris et al., 2000), y FGD5 se expresa selectivamente en las células endoteliales (Ho et al. 2003), donde la estimulación por VEGF induce su expresión (Hernández-García et al. 2015). Participa en la regulación de la adhesión endotelial, la supervivencia y la angiogénesis (Nakhaei-Nejad et al., 2012) y varios estudios indican que contribuye a los procesos de proangiogénesis en células endoteliales (Kurogane et al., 2012; Farhan et al. 2017; Heldin et al. 2017).

4.5 FGD6 (*FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 6*)

Con respecto a FGD6, se ha reportado que participa en varios procesos dependientes de actina en osteoclastos, coordinando la polaridad y el reciclado de endosomas en estas células por una vía que involucra a Cdc42 (Steenblock et al., 2014). Hasta el momento se ha descrito su expresión en retina (Huang et al., 2016) y osteoclastos (Steenblock et al., 2014). Un polimorfismo de FGD6 resulta en una localización intracelular alterada de la proteína, alteraciones en el citoesqueleto celular y un mayor riesgo de degeneración macular por promoción de la vascularización de la retina (Huang et al., 2016). Un estudio más reciente postula que una variante *missense* de FGD6 en heterocigosis correlaciona

con el autismo (Thongnak et al., 2018), aunque no hay información acerca del nexo entre la patología y la mutación en FGD6.

Hasta el presente no hay evidencia disponible en referencia a una posible acción de FGD6 en el Sistema Nervioso Central. Recientemente, se ha realizado una amplia caracterización de la especificidad de los RhoGEFs y RhoGAPs de las diferentes Rho GTPasas, como así también sus interactomas y su localización subcelular. El estudio no arroja una actividad específica de FGD6 sobre ninguna de las Rho GTPasas analizadas, pero si una asociación estrecha de esta proteína con el citoesqueleto de actina y con reguladores de vías de señalización de Cdc42 y Rac1. El análisis del interactoma indica que FGD6 estaría interactuando con ARHGAP33 y a ARHGEF16, formando un complejo (Müller et al., 2020). Con respecto a ARHGAP33, está reportado que regula la formación de dendritas y el desarrollo de espinas dendríticas a través de Cdc42 (Rosário et al., 2007), está asociado a comportamientos similares al autismo en un modelo de ratón con pérdida de función por mutación en el gen ARHGAP33 (Schuster et al., 2015) y, se lo caracterizó como un inhibidor de la actividad de Rac1 (Müller et al., 2020). Por otra parte, ARHGEF16 está implicado en la inactivación de RhoA durante la regeneración del nervio óptico (Matsukawa et al., 2018) y participa en la activación de Cdc42 (Oliver et al., 2011). Recientemente, Casalia y colaboradores (2021), identificaron una mutación en el gen que codifica para la proteína FGD6 en pacientes con Epilepsia Focal Autolimitada de la Infancia (SFEC) como un factor genético putativo que podría contribuir al desarrollo de este trastorno.

De todo lo descripto anteriormente se desprende que la participación de las Rho GTPasas y sus reguladores, como FGD6, en procesos biológicos mediados por el citoesqueleto de actina los posiciona como actores fundamentales de la fisiología neuronal. Como se mencionó en la sección anterior (4.4), alteraciones o fallas en esta regulación podrían contribuir al desarrollo de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. Dilucidar los mecanismos de regulación de las vías de señalización de estas proteínas podría aportar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de los diferentes desórdenes neurológicos. Por todo esto, en el presente trabajo estudiamos la relevancia funcional de FGD6 en neuronas como nuevo modulador de vías específicas que impactan en la dinámica del citoesqueleto de actina.

Hipótesis y Objetivos

1- HIPÓTESIS

En las neuronas, FGD6 es un regulador de la actividad de las Rho GTPasas necesario para la organización dinámica del citoesqueleto de actina y, por lo tanto, del desarrollo normal de procesos neuronales tales como la diferenciación, la polarización y la neuritogénesis.

2- OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la función de FGD6 en las neuronas como nuevo modulador de vías específicas que impactan en la dinámica del citoesqueleto de actina.

3- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I- Analizar la expresión de FGD6 durante la diferenciación neuronal en los modelos celulares *in vitro*: **a-** La línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH; **b-** Cultivos primarios de neuronas corticales de rata.

II- Analizar la actividad de las Rho-GTPasas Rac1 y Cdc42, en la línea celular SK-N-SH transfectada con un conjunto de ARN pequeños de interferencia específicos para FGD6 (siRNA FGD6) o secuencias *scramble*.

III- Analizar la expresión de diversas proteínas efectoras río abajo de Rac1 y la organización del citoesqueleto de actina al disminuir la expresión de FGD6 en la línea celular SK-N-SH.

IV- Investigar las implicancias de la mutación p.E276G en homocigosis presente en FGD6 en pacientes con Epilepsia Focal Autolimitada de la Infancia (SFEC) sobre el citoesqueleto de actina.

Resultados

1- CARACTERIZACIÓN DE FGD6: ANÁLISIS DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA Y EXPRESIÓN DEL GEN DURANTE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL

FGD6 pertenece a una familia de proteínas, cuyos miembros comparten una organización estructural similar, presentando una región carboxilo terminal altamente conservada y un extremo amino terminal único para cada miembro del grupo. Esta organización estructural les permitiría a las proteínas actuar como nexo entre las señales provenientes de la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina (revisado en Nakanishi y Takai, 2008). Recientemente se ha reportado que varios miembros de la familia FGD tienen función descrita de GEF para la Rho GTPasa Cdc42 y/o la Rho GTPasa Rac1 (Müller et al., 2020). Estas Rho GTPasas han sido estudiadas como reguladoras y coordinadoras de la remodelación del citoesqueleto de actina, participando en diversos procesos biológicos durante el desarrollo del Sistema Nervioso (revisado en Kalpachidou et al., 2019). Con respecto a FGD6, hasta el momento no se ha reportado que tenga actividad de GEF para ninguna Rho GTPasa ni se ha descrito su función en el Sistema Nervioso Central, pero debido a la similitud de estructura con otros miembros de la familia más estudiados se postula que podría modular la actividad de Cdc42 y/o de Rac1.

Comenzamos este trabajo realizando una caracterización general de FGD6. En primera instancia, estudiamos *in silico* la estructura terciaria de la proteína. Dado que los miembros de la familia FGD comparten una organización estructural similar, pero el extremo N-terminal es único para cada miembro de la familia, analizamos especialmente la estructura terciaria y las modificaciones postraduccionales de esta región. Este análisis fue realizado para poder estimar si la región N-terminal estaba involucrada en la función de la proteína y/o era requerida para la interacción con otras proteínas. Por otro lado, determinamos la expresión del ARNm de FGD6 y analizamos la localización celular de la proteína durante la diferenciación neuronal empleando dos modelos celulares *in vitro*.

1.1 El extremo N-terminal de FGD6 es intrínsecamente desordenado, con alta probabilidad de interactuar con otros dominios/ proteínas ordenadas y conteniendo varios sitios de fosforilación

En una primera aproximación, utilizamos el software provisto por el sitio IUPred2A (<https://iupred2a.elte.hu/>), con el cual analizamos la proteína en base a un modelo biofísico de plegamiento proteico (Dosztányi et al., 2005). El uso de este software nos permitió identificar regiones de la proteína que se encuentran intrínsecamente desordenadas (regiones que carecen de una estructura monomérica estable en condiciones nativas). Se ha estudiado ampliamente que las proteínas/ regiones intrínsecamente desordenadas (IDP/ IDR, por sus siglas en inglés) frecuentemente funcionan como centros en las redes de interacción de proteínas, en la regulación de las vías de señalización y en procesos celulares cruciales (revisado en Wright y Dyson, 2015).

Cuando ingresamos la secuencia aminoacídica de la proteína, el software nos devolvió una puntuación entre 0 y 1 para cada residuo (valores que correspondieron a la probabilidad de que el residuo dado sea parte de una región desordenada). Los valores por encima de 0,5 correspondieron a residuos con alta probabilidad de asignación correcta a una región desordenada. Asimismo, se ha reportado que la naturaleza desordenada de un segmento de proteína puede depender del contexto: ciertas regiones pueden cambiar entre un estado ordenado y un estado desordenado dependiendo del contexto en el que se encuentre la proteína (Mészáros et al., 2018). El software empleado también nos permitió identificar regiones proteicas que adoptaban o no una estructura estable dependiendo del estado redox de su entorno por medio del algoritmo ANCHOR2.

Como se muestra en la Figura R1, el algoritmo IUPred2 nos permitió estimar qué regiones de la proteína FGD6 se encontraban desordenadas/ ordenadas. Este algoritmo determinó que el extremo N-terminal de FGD6 presentaba una secuencia aminoacídica con una conformación laxa, con una mayor probabilidad (valores cercanos a 1) de carecer de una estructura monomérica estable en la región comprendida entre los residuos aminoacídicos 760 y 880 (Figura R1, línea roja, región señalizada en verde).

El algoritmo ANCHOR2 estimó las secuencias aminoacídicas que se corresponderían a regiones intrínsecamente desplegadas que pueden unirse a un dominio ordenado. Este algoritmo mostró que la secuencia aminoacídica comprendida entre las posiciones 760 y 880 del extremo N-terminal de FGD6, correspondería a una región intrínsecamente desplegada que sería capaz de unirse a dominios ordenados (Figura R1, línea azul, región señalizada en verde).

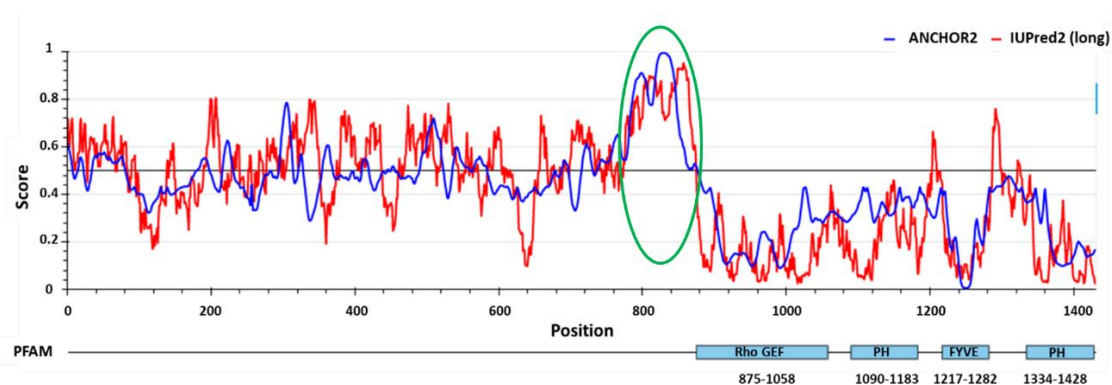


Figura R1 Análisis mediante el software de IUPred2A de la secuencia aminoacídica de FGD6 humano. Se muestra en color rojo, la probabilidad de cada residuo de ser parte de una región desordenada, según el análisis mediante el algoritmo IUPred2. En azul, se muestra la probabilidad para cada residuo de pertenecer a una región desordenada, pero que puede unirse a un dominio ordenado, según el análisis mediante el algoritmo ANCHOR2. La región comprendida entre los residuos aminoacídicos 760 y 880 se encuentra remarcada con un círculo verde. En la parte inferior de la figura se muestran los dominios estructurales característicos de la familia FGD (PFAM).

Los resultados obtenidos mediante el software de IUPred2A sugieren que FGD6 podría potencialmente unirse a distintas proteínas por medio de su región N-terminal.

Extensas evidencias han puesto de manifiesto que una de las características que poseen las proteínas/ regiones intrínsecamente desordenadas es que presentan sitios accesibles para ser modificados post-traduccionalmente. Estas modificaciones post-traduccionales (MPT), implicadas en cambios conformacionales de las proteínas, permitirían regular finamente la interacción con otras proteínas o regiones ordenadas (revisado en Wright y Dyson, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que muchas proteínas de señalización, incluidas las proteínas RhoGEF, están reguladas negativamente en *cis* por secuencias autoinhibitorias (revisado en Pufall y Graves, 2002). Trudeau y colaboradores (2013) mostraron, por medio de un análisis bioinformático, que las secuencias autoinhibitorias estaban enriquecidas en regiones desordenadas,

contenían múltiples sitios de fosforilación y presentaban variabilidad estructural, garantizando de esta manera un control fino de la activación de las proteínas de señalización.

Dado que, FGD6 posee en su extremo C-terminal los dominios estructurales de las proteínas RhoGEF (implicados en la activación de Rho GTPasas) y su extremo N-terminal características de IDR, decidimos investigar si la proteína presentaba sitios con MPT que sean características de las IDR y de secuencias autoinhibitorias. Para ello, empleamos la base de datos PhosphoSitePlus (Hornbeck et al., 2015) la cual nos proporcionó información y herramientas para el estudio de las MPT incluidas, entre otras, la fosforilación.

Como muestra la figura R2, este análisis permitió identificar 14 sitios potenciales de fosforilación en la proteína FGD6 en las posiciones: Y162, S515, S554, N574, S605, Y691, S692, Y696, S721, Y737, Y748, Y754, Y760 y S1197. Salvo la fosforilación en S1197 ubicada en el extremo C-terminal, el resto de las fosforilaciones se encontraron en la región N-terminal. Sorprendentemente, 12 sitios de fosforilación reportados estaban ubicados en una región acotada (comprendida entre los aminoácidos 515 y 760) que, además, es la secuencia adyacente a la región intrínsecamente desordenada de la proteína (secuencia aminoacídica comprendida entre las posiciones 760 y 880).

Dado que las fosforilaciones son MPT características de las IDR y de las regiones autoinhibitorias (Trudeau et al., 2013), este dato reforzó el resultado obtenido por el software IUPRED2A, el cual predijo que el extremo N-terminal de FGD6 presentaba características de IDR. Además, dichas fosforilaciones en la región N-terminal de FGD6 podrían estar implicadas en cambios conformacionales que regulen la actividad putativa de FGD6 y/o su interacción con otras proteínas.

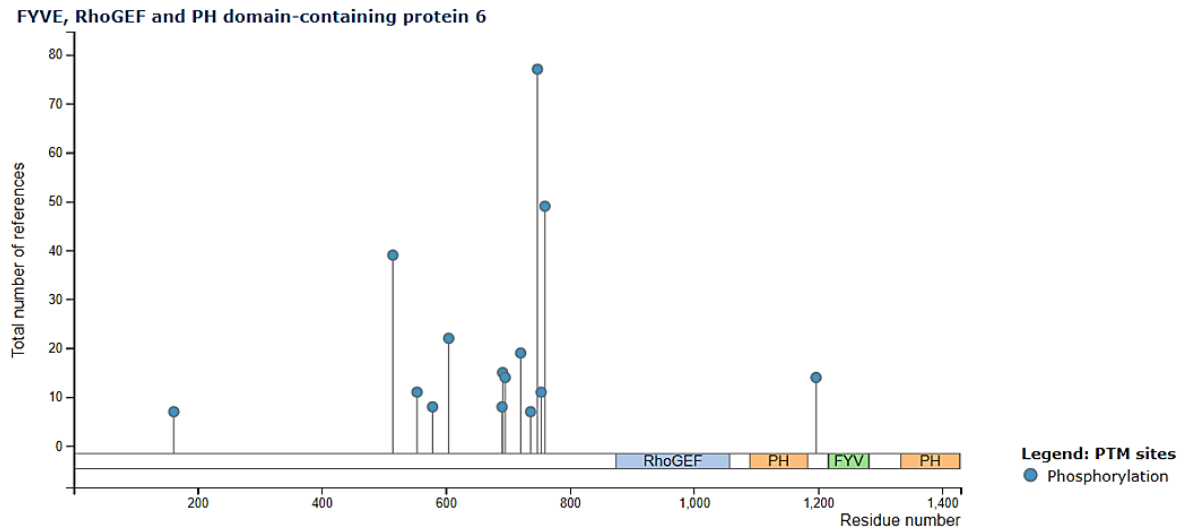


Figura R2 Análisis mediante el software PhosphoSitePlus de la secuencia aminoacídica de FGD6 humana. Se muestran las modificaciones postraduccionales. Todas las modificaciones corresponden a fosforilaciones en las posiciones: Y162, S515, S554, N574, S605, Y691, S692, Y696, S721, Y737, Y748, Y754, Y760 y S1197.

En su conjunto, los resultados obtenidos empleando los softwares de IUPred2A y PhosphoSitePlus nos permitieron caracterizar *in silico* a la región N-terminal de FGD6 como una región intrínsecamente desordenada o IDR. Esta región presentó, por un lado, mayor probabilidad de interactuar con otros dominios/proteínas ordenadas entre las posiciones aminoacídicas 760 y 880 (IDR); y, por otro lado, 12 posibles sitios de fosforilación en la región adyacente a la zona predicha como IDR que podrían modular cambios estructurales de la proteína, regulando posiblemente una autoinhibición y/o unión a *partners*.

1.2 La expresión de FGD6 mostró una modulación durante la diferenciación neuronal *in vitro*

Como se mencionó anteriormente, no se ha reportado ni caracterizado la función de FGD6 en el SNC. Por lo tanto, en una primera instancia, evaluamos la expresión de FGD6 en la línea de neuroblastoma humano SK-N-SH en la cual, los precursores neuronales pueden ser diferenciados a un estadio celular más maduro por el agregado de agentes diferenciadores al medio de cultivo. En esta línea celular se han descrito protocolos de inducción de la diferenciación muy bien establecidos (Sidell et al., 1983; Preis et al., 1998) y una amplia bibliografía que avala su uso como modelo celular (Thiele, 1998)

(revisado en Abemayor y Sidell, 1989). En particular, diferenciamos las células por medio de un tratamiento con ácido retinoico (AR). Brevemente, las células fueron plaqueadas y a las 24 h, tratadas con *all-trans* AR 10 μ M durante 9 días. A día 3, 6 y 9 del tratamiento, las células fueron cosechadas, el ARN obtenido y se determinó la expresión de FGD6 mediante RT-qPCR. Los controles fueron células sin diferenciar que se trataron con DMSO (vehículo en el cual se diluyó el AR) (Figura R3 A).

El análisis de la expresión de FGD6 a lo largo de la diferenciación reveló que la línea SK-N-SH presenta una modulación de los niveles de ARNm. Los resultados obtenidos por RT-qPCR mostraron que, a día 3 (DIV3) del tratamiento con AR, no hubo diferencias significativas en los niveles de ARNm de FGD6 con respecto a las células controles tratadas con DMSO; mientras que, a día 6 (DIV6) las células tratadas con AR disminuyeron significativamente los niveles de expresión de FGD6 con respecto al DIV3 de tratamiento con AR; y finalmente, a día 9 (DIV9) de tratamiento con AR observamos que los niveles de expresión de FGD6 presentaron una tendencia a aumentar nuevamente hacia valores similares a los observados a DIV3 (Figura R3 B). Con el fin de estudiar las veces de cambio en los niveles de expresión de FGD6, los valores de ARNm obtenidos por RT-qPCR fueron relativizados a los valores obtenidos por las células sin diferenciar (control: tratadas con DMSO) cuyos valores de ARNm de FGD6 se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo.

Estos resultados nos permitieron concluir que, en estadios tempranos de la diferenciación neuronal la expresión de FGD6 disminuye significativamente, y revierte conforme las células siguen madurando.

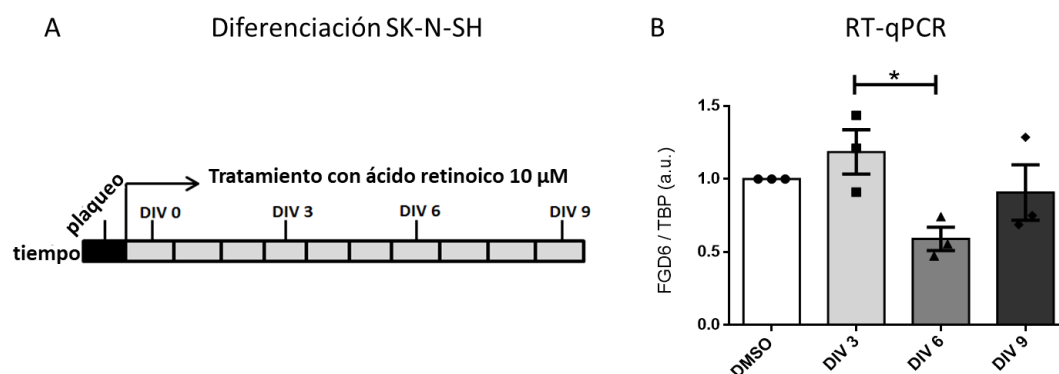


Figura R3 Modulación de la expresión de FGD6 durante la diferenciación neuronal de la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH.

A- Protocolo de diferenciación de la línea SK-N-SH. Las células fueron plaqueadas y a las 24 h, tratadas con *all-trans* AR 10 μM durante 9 días. A día 3, 6 y 9 del tratamiento, las células fueron cosechadas, el ARN obtenido y se determinó la expresión de FGD6 mediante RT-qPCR. Los controles fueron tratados con DMSO.

B- Niveles de expresión de FGD6 determinados mediante RT-qPCR. Los valores están expresados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes y normalizados a los controles. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de medidas repetidas de un factor seguido por la prueba post hoc Tukey para comparaciones múltiples. * $p \leq 0,05$.

Adicionalmente, estudiamos la evolución temporal de la expresión de FGD6 durante la diferenciación de cultivos de neuronas corticales de rata. Elegimos este segundo modelo celular dado que la homología de FGD6 entre especies está altamente conservada (identidad mayor al 70% para las proteínas de humano y rata). Asimismo, en los cultivos primarios el tiempo de maduración es similar al de la línea celular SK-N-SH (14 días) y no es necesario el agregado de agentes diferenciadores al medio de cultivo.

Los cultivos primarios de neuronas corticales de rata obtenidos fueron caracterizados por inmunocitoquímica. Este análisis se realizó mediante una marcación de las neuronas con un anticuerpo anti- β -tubulina (marcador pan-neuronal) y una marcación de astrocitos con un anticuerpo anti-GFAP (marcador astrocitario). Con el protocolo empleado se logró obtener un cultivo celular con una pureza del 94% (Figura R4).

Pureza de los cultivos primarios de Neuronas Corticales de rata

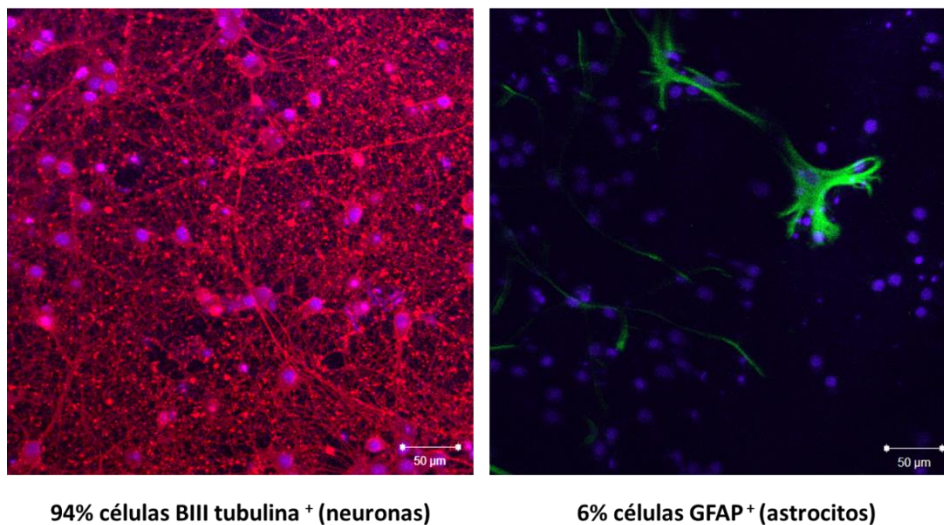


Figura R4 Caracterización por inmunocitoquímica de la pureza de los cultivos primarios de neuronas corticales de rata obtenidos. Las células fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo anti- β tubulina (marcador neuronal, rojo), con un anticuerpo anti-GFAP (marcador astrocitario, verde) y los

correspondientes anticuerpos secundarios. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss- LSM 510 META, analizadas con el programa del LSM y el software ImageJ. Barra de escala, 50 μm . Con el protocolo empleado se logró obtener una pureza del 94%.

Se evaluó la expresión del ARNm de FGD6 a lo largo de la diferenciación de neuronas corticales de rata a DIV3, DIV7, DIV10 y DIV14 por RT-qPCR. Los resultados obtenidos mostraron un patrón de expresión similar al observado en las células humanas. En los inicios del proceso de diferenciación (DIV3-DIV7), no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión de FGD6 si bien conforme avanza la diferenciación, la expresión de FGD6 disminuye. En los estadios más avanzados del proceso madurativo (DIV10), los niveles de expresión de FGD6 disminuyeron significativamente. Finalmente, cuando las neuronas se encuentran maduras (DIV14), los niveles de expresión tendieron a aumentar y alcanzar los niveles observados en el comienzo de este proceso celular (Figura R5 A).

Intentamos analizar la expresión de la proteína por Western Blot. A pesar de que contábamos con un anticuerpo específico, FGD6 presentó bajos niveles de expresión de proteína en las neuronas y su detección mediante esta técnica no fue posible en ninguno de los dos modelos celulares empleados.

Debido a las dificultades mencionadas anteriormente optamos por utilizar una técnica de microscopia para profundizar el análisis de FGD6. Así, en el cultivo primario de neuronas corticales de rata, analizamos por inmunocitoquímica la expresión de FGD6 durante el proceso de diferenciación celular. Para este experimento las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-FGD6 y se analizó la expresión de la proteína por inmunofluorescencia. Este análisis se acompañó con una marcación de las neuronas con un anticuerpo anti-BIII tubulina (marcador pan-neuronal). Las imágenes obtenidas mostraron que, por un lado la proteína se localizó homogéneamente en el citoplasma, tanto en el soma como en los procesos de las células; y por otro lado, que la intensidad de fluorescencia de la proteína se condijo temporalmente con los niveles de expresión del ARNm: la intensidad de la marcación de FGD6 disminuyó cuando las células comenzaron a diferenciarse y luego presentó una tendencia a volver a la intensidad inicial conforme las células siguieron con la maduración (Figura R5 B).

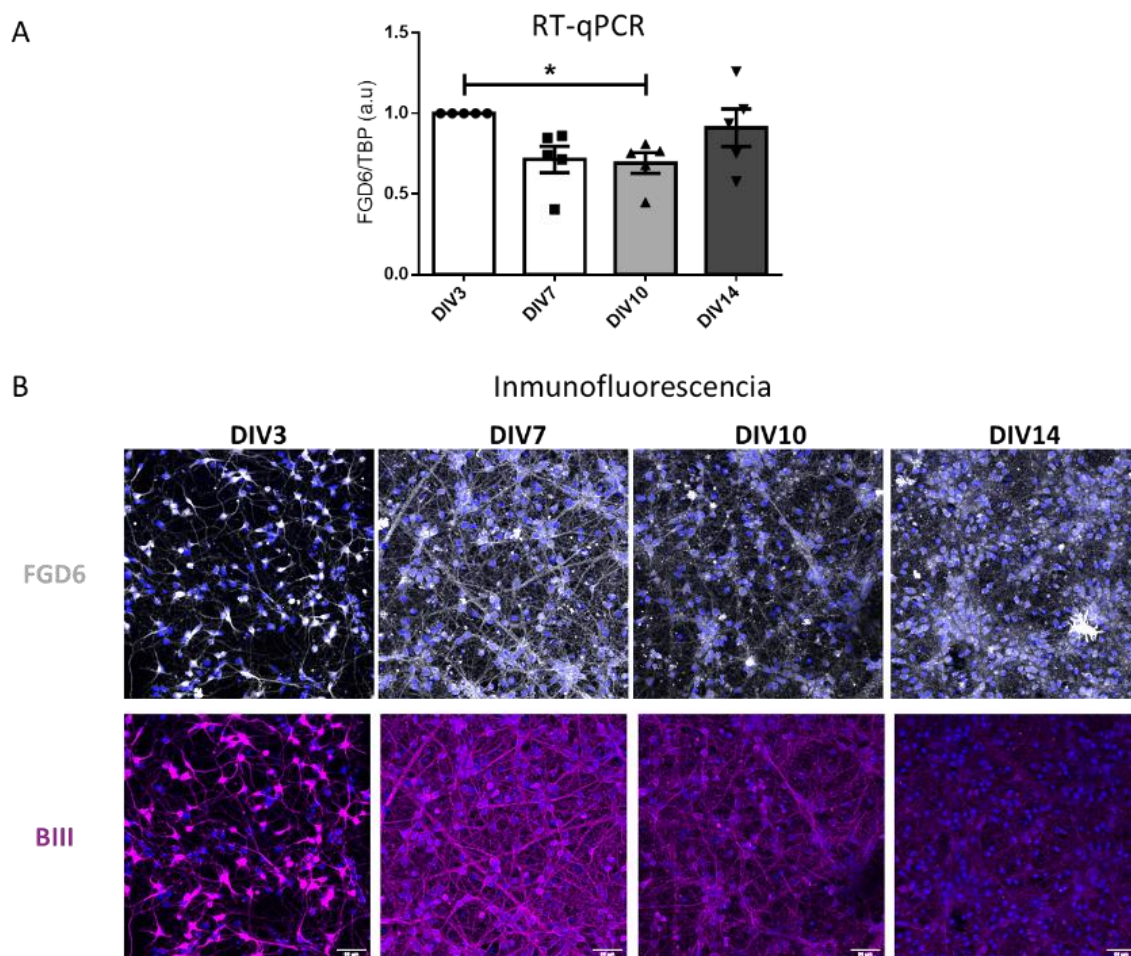


Figura R5 Durante la diferenciación de un cultivo primario de neuronas corticales de rata los niveles de FGD6 disminuyen y revierten conforme las células siguen madurando.

A- Expresión de FGD6 por RT-qPCR en neuronas corticales de rata. Los valores están expresados como la media \pm SEM de cinco experimentos independientes, los niveles de ARNm fueron normalizados a los valores obtenidos en el DIV3. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de medidas repetidas de un factor seguido por la prueba post hoc Tukey para comparaciones múltiples. * $p \leq 0,05$.

B- Expresión de FGD6 a lo largo de la diferenciación de neuronas corticales de rata. Las células fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo anti-FGD6 (gris), con anti-BIII tubulina (marcador neuronal, magenta), Hoechst-33258 (núcleos) y los correspondientes anticuerpos secundarios. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss- LSM 510 META, analizadas con el programa del LSM y el software ImageJ. Barra de escala, 50 μ m.

En conjunto, los resultados obtenidos empleando dos modelos celulares de especies diferentes nos permitieron concluir que, en neuronas, la expresión de FGD6 se encuentra finamente regulada durante la diferenciación celular *in vitro*. En ambos modelos observamos que, a medida que progresa la diferenciación neuronal la

expresión de FGD6 disminuye significativamente y en estadios más maduros tiende a volver a aumentar.

2- ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA AL DISMINUIR LA EXPRESIÓN DE FGD6

Si bien la actividad de GEF fue descrita para algunos miembros de la familia FGD (Müller et al., 2020), hasta el momento no hay una caracterización en relación con la actividad de FGD6 ni de sus posibles proteínas interactoras. No se ha reportado que FGD6 tenga actividad de GEF para ninguna Rho GTPasa, pero debido a la alta homología estructural con otros miembros de la familia más estudiados, su acción podría estar relacionada con la actividad de Cdc42 y/o de Rac1. En Sistema Nervioso, numerosos estudios experimentales reportaron que estas Rho GTPasas median cambios del citoesqueleto de actina, participando en diversos procesos celulares (revisado en Kalpachidou et al., 2019).

En esta sección empleamos como sistema de estudio la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH, en la cual logramos disminuir la expresión de FGD6 por medio de ARN pequeños de interferencia (siRNA). En una primera aproximación, evaluamos el posible efecto de la disminución de FGD6 sobre las Rho GTPasas Cdc42 y Rac1. Para ello, empleamos una herramienta que nos permitió medir la actividad de estas GTPasas por transmisión de energía de resonancia (FRET) *in vitro*. Por medio de la técnica de Western Blot analizamos algunas proteínas efectoras del citoesqueleto de actina río abajo de Rac1. Mediante la tinción con faloidina examinamos la organización del citoesqueleto de actina. Finalmente, a partir de extractos celulares obtuvimos actina filamentosa (F) y actina monomérica libre (G) y mediante la técnica de Western Blot, evaluamos la dinámica de la actina.

2.1 Sistema de trabajo: células de la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH transfectadas con un conjunto de siRNAs específicos para FGD6

La primera parte de este trabajo consistió en poner a punto las condiciones de transfección de las células de neuroblastoma humano SK-N-SH con un conjunto de ARN pequeños de interferencia específicos para FGD6 (siRNA FGD6), de modo de establecer un modelo de estudio con niveles de expresión del gen disminuidos. Para ello, ensayamos distintas relaciones de siRNA: agente transfectante y distintos agentes transfectantes. El protocolo de transfección seleccionado y empleado para los

experimentos posteriores se muestra en la Figura R6 A. La relación óptima obtenida fue la relación 1:3 (siRNA: agente transfectante). Con estas condiciones observamos, mediante ensayos de RT-qPCR, una disminución significativa de la expresión del gen de aproximadamente el 50% (Figura R6 B), independientemente del agente de transfección empleado. Adicionalmente, evaluamos la expresión de la proteína FGD6 mediante inmunocitoquímica. Para este experimento las células fueron transfectadas con un conjunto de siRNAs específicos para FGD6 (siRNA FGD6) o un conjunto de siRNAs desordenados (*Scramble*) y luego fijadas e incubadas con un anticuerpo anti FGD6. Las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas mostraron resultados que acompañan a los obtenidos por RT-qPCR. Las células transfectadas con siRNA FGD6 evidenciaron una menor intensidad de fluorescencia de la proteína en comparación con las células transfectadas con las secuencias *Scramble* (Figura R6 C). Estos resultados permitieron corroborar la eficiencia del siRNA empleado.

Es importante mencionar que en los experimentos donde los ensayos se realizaron con un *pool* de células (RT-qPCR, Western Blot) el análisis de los resultados puede estar subestimado debido a que la eficiencia de transfección obtenida con este protocolo fue de aproximadamente 50-60%.

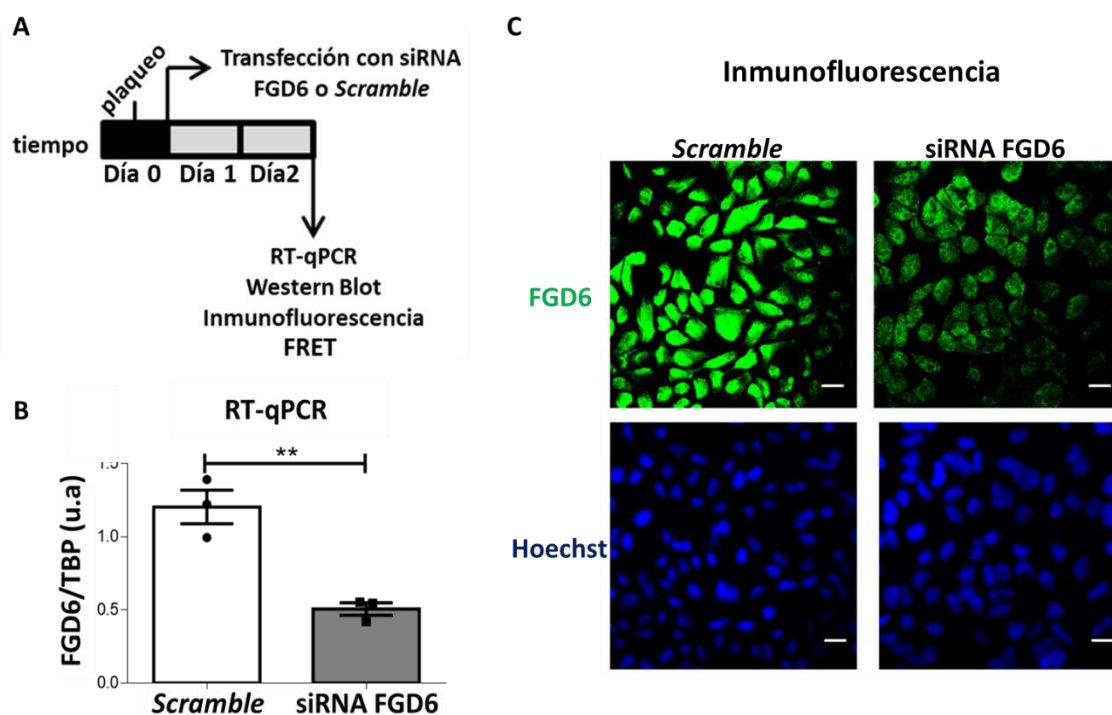


Figura R6 Células trasfectadas con siRNA FGD6 muestran una disminución aproximada al 50% en la expresión del gen y una menor intensidad de fluorescencia de la proteína.

A-Protocolo experimental. Las células SK-N-SH fueron plaqueadas y a las 24 h transfectadas con siRNA específico para FGD6 o secuencias *Scramble*. Una vez agregada la mezcla de transfección, se cultivaron adicionalmente durante 48/72 h y posteriormente fueron procesadas para su análisis de acuerdo con el ensayo realizado.

B- Control de silenciamiento. Niveles de expresión de FGD6 determinados mediante RT-qPCR. Los valores están expresados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes, los niveles de ARNm fueron normalizados a los valores obtenidos en las células tratadas con las secuencias *Scramble*. El análisis estadístico se realizó con Paired T-test. $**p \leq 0,01$.

C- Expresión de FGD6 evaluada por Inmunoquímica. Células SK-N-SH transfectadas con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble*, fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo anti-FGD6, con Hoechst-33258 (núcleos) y el correspondiente anticuerpo secundario. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss- LSM 510 META, analizadas con el programa del LSM y el software ImageJ. Barra de escala, 20 μ m.

En estas condiciones se procedió a evaluar el impacto de la disminución en los niveles de ARNm de FGD6 en la organización del citoesqueleto de actina.

2.2 La disminución de la expresión de FGD6 produjo un aumento significativo en la actividad basal de Rac1, pero no afectó la actividad basal de Cdc42

Se ha descrito que las Rho GTPasas Cdc42 y Rac1 tienen en común muchas proteínas efectoras del citoesqueleto que activan una cascada de señalización que termina en la inducción de la polimerización de los monómeros de actina y en la regulación del *turnover* de los filamentos de actina (revisado en Heasman y Ridley, 2008). En el SNC, ambas GTPasas están implicadas en procesos que requieren de la remodelación del citoesqueleto de actina, como la polaridad neuronal, morfología celular, sinapsis y formación de espinas dendríticas (revisado en Coles y Bradke, 2015; Muñoz-Lasso et al., 2020).

Con el fin de examinar más a fondo el papel de FGD6 en la actividad de las Rho GTPasas Rac1 y Cdc42, realizamos un ensayo de transferencia de energía de resonancia (FRET) que utiliza sondas que reportan *in vitro* el equilibrio local entre las actividades de los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) y las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) para Rac1 y Cdc42 (Itoh et al., 2002). En este sistema reportero, el dominio de unión a Cdc42 y Rac1 de PAK1 está unido a través de un enlace flexible a Cdc42 o a Rac1.

Cuando Rac1 o Cdc42 se encuentran unidas a GDP, se observa emisión de fluorescencia a 475 nm que corresponde a la emisión de CFP solamente (Figura R7, esquema *low FRET*). En presencia de GTP, el dominio de unión a Cdc42 y Rac1 de PAK1 se une a la GTPasa, alterando la conformación espacial entre las unidades YFP y CFP flanqueantes. Esta interacción, entre CFP y YFP, permite la consecuente transferencia de energía entre ambas sondas y una emisión de fluorescencia por parte de YFP a 527 nm (Figura R7, esquema *high FRET*).

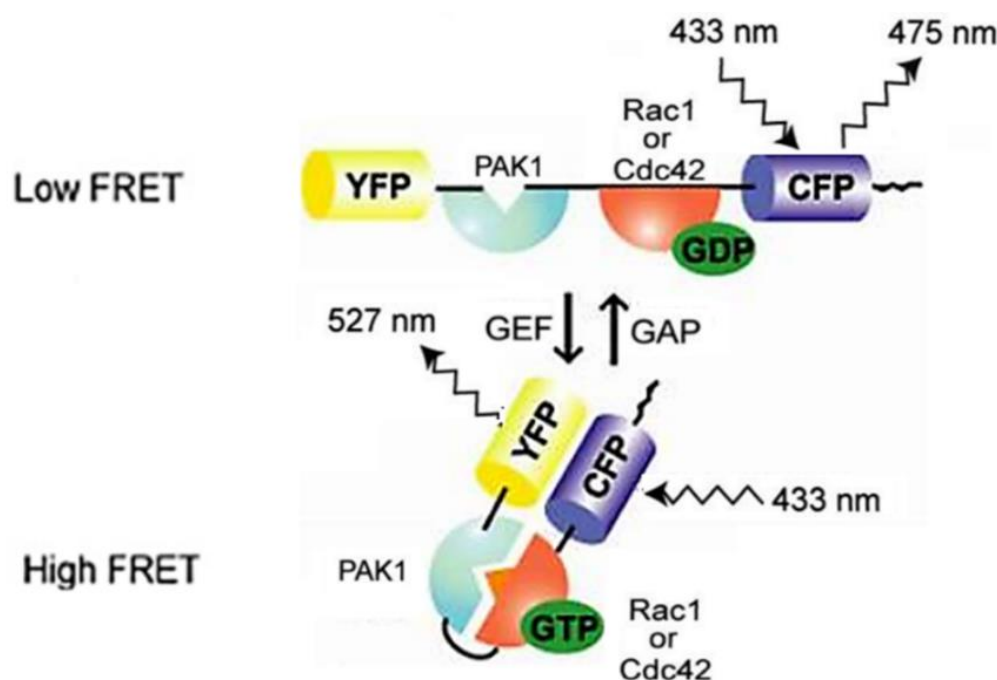


Figura R7 Diagrama esquemático del biosensor de Cdc42/ Rac1 unido a GDP o GTP. **Low FRET:** Cuando Rac1 o Cdc42 se une a GDP, se observa la fluorescencia a 475 nm que emite CFP solamente. **High FRET:** Cuando Rac1 o Cdc42 se une a GTP, la unión intramolecular del sensor ahora activado a PAK1 acerca espacialmente YFP a CFP, lo que provoca FRET y se observa la fluorescencia a 527 nm que emite YFP. Esquema tomado de: <https://www.fret.lif.kyoto-u.ac.jp/e-phogemon/raichu-Rac.htm>

De esta forma, se co-transfectaron células SK-N-SH con siRNA FGD6 y el biosensor de Cdc42 o de Rac1 y se evaluaron los datos de fluorescencia de cada biosensor por FRET. Como se observa en la Figura R8, para el biosensor de Cdc42 no se encontraron diferencias en los niveles de FRET del reportero al comparar las células tratadas con siRNA FGD6 con las células tratadas con secuencias *Scramble*. Este resultado nos permitió concluir que, en condiciones basales, FGD6 no modularía la actividad de Cdc42.

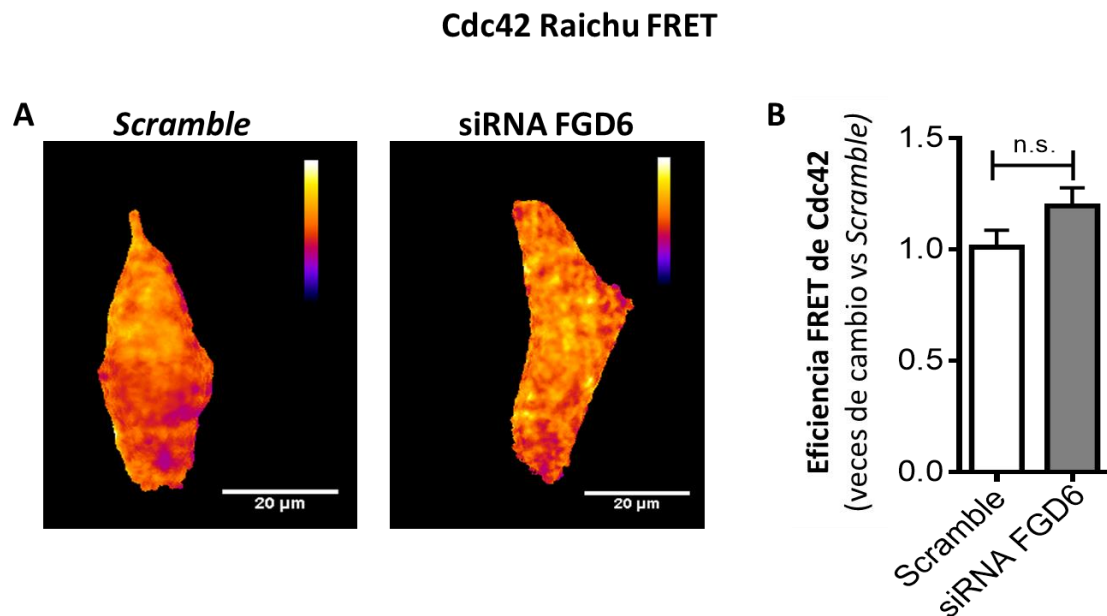


Figura R8 La actividad basal de Cdc42 no se ve alterada cuando disminuye la expresión de FGD6.

A- Células SK-N-SH co-transfectadas con el biosensor de Cdc42 y siRNA FGD6 o secuencias *Scramble* fueron fijadas 48 h post transfección y se colectaron los datos de fluorescencia emitidos por CFP y YFP para evaluar los niveles de FRET del biosensor. Se muestran imágenes representativas de los mapas de FRET de Cdc42. Barra de escala, 20 µm.

B- Cuantificación de la eficiencia de FRET en toda la célula. Los valores están expresados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes, los valores fueron normalizados a los valores obtenidos en las células transfectadas con secuencias *Scramble*. El análisis estadístico se realizó con Mann Whitney test. n.s: No hay diferencias significativas entre tratamientos.

Sorprendentemente, cuando se realizó el ensayo para el biosensor de Rac1 se observó que las células con expresión de FGD6 disminuida presentaban un aumento significativo de aproximadamente el 50% de la eficiencia de FRET del reportero (Figura R9). Esto indicaría que FGD6 estaría modulando la actividad de esta GTPasa.

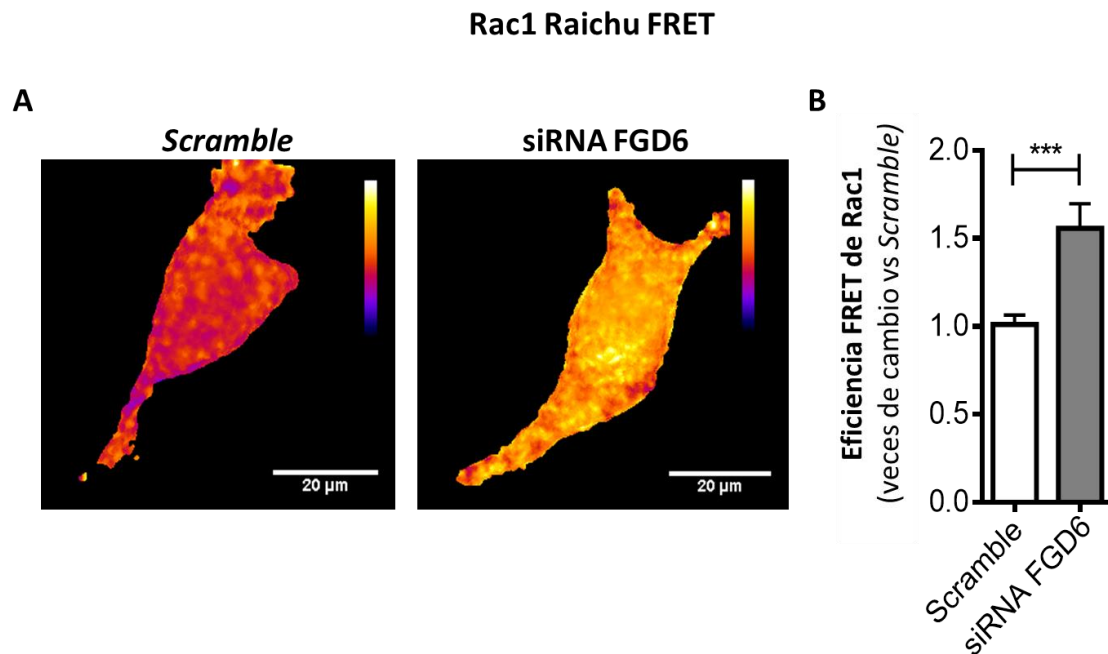


Figura R9 La actividad basal de Rac1 aumenta significativamente cuando disminuye la expresión de FGD6.

A- Células SK-N-SH co-transfectadas con el biosensor de Rac1 y siRNA FGD6 o secuencias *Scramble* fueron fijadas 48 h post transfección y se colectaron los datos de fluorescencia emitidos por CFP y YFP para evaluar los niveles de FRET del biosensor. Se muestran imágenes representativas de los mapas de FRET de Rac1. Barra de escala, 20 μm .

B- Cuantificación de la eficiencia de FRET en toda la célula. Los valores están expresados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes, los valores fueron normalizados a los valores obtenidos en las células transfectadas con secuencias *Scramble*. El análisis estadístico se realizó con Mann Whitney test. *** $p \leq 0,001$.

Existen numerosas proteínas *scaffold* que interactúan simultáneamente con reguladores de actividad de las Rho GTPasas y con proteínas efectoras del citoesqueleto de actina, estableciendo así la especificidad de la señalización de las GTPasas de manera espacio-temporal (Marinissen y Gutkind, 2005). Los resultados obtenidos en el ensayo de FRET fueron sumamente interesantes dado que, en condiciones basales, es decir, sin estimular las vías de señalización de las Rho GTPasas, FGD6 estaría modulando negativamente la actividad de Rac1 directa y/o indirectamente a través de factor(es) que podrían interaccionar con la Rho GTPasa y/o con distintos componentes de las vías de señalización de la misma.

2.3 Análisis de proteínas efectoras del citoesqueleto de actina río abajo de Rac1

Los resultados obtenidos por FRET, donde una menor expresión de FGD6 resultó en un aumento de la actividad basal de Rac1 sugirieron que esta hiperactividad podría estar afectando a proteínas efectoras del citoesqueleto de actina ubicadas río abajo de la cascada de señalización de Rac1. Tanto esta Rho GTPasa como Cdc42 activan principalmente dos cascadas de fosfo/ desfosforilaciones que regulan el remodelado del citoesqueleto de actina. Una de ellas, la vía de señalización canónica de Rac1, incluye a PAK, a LIMK y a Cofilina y, regula el *turnover* de los filamentos de actina. La otra vía de señalización está mediada por Cortactina, finaliza con la activación del complejo Arp2/3 y regula la polimerización de los monómeros de actina (Urano et al., 2001) (revisado en Heasman y Ridley, 2008).

En esta sección evaluamos el posible efecto de la disminución de FGD6 sobre algunas proteínas efectoras del citoesqueleto de actina correspondientes a la vía canónica de Rac1 mediante la técnica de Western Blot.

2.3.1 La disminución en la expresión de FGD6 no produjo diferencias en los niveles de fosforilación de LIMK1 ni de Cofilina.

Se ha reportado que la quinasa PAK es uno de los principales efectores de Rac1. Así, una vez que PAK se ha activado por su interacción con Rac1, se autofosforila y mantiene una conformación activada (Zhao y Manser, 2012). PAK en su estado fosforilado (activo) fosforila a LIMK activándola, la cual fosforila a Cofilina inactivándola y estabilizando de esta manera los filamentos de actina. Cuando Cofilina se encuentra desfosforilada (activa) promueve el acortamiento y el *turnover* de las subunidades de los filamentos (revisado en Bamburg et al, 2021). Dada la importancia de Cofilina en la regulación de la extensión de los filamentos de actina y de LIMK como uno de sus principales reguladores decidimos analizar el estado de fosforilación de ambas proteínas en esta sección de experimentos. Los mismos fueron realizados en condiciones de silenciamiento parcial de FGD6.

Así, analizamos el estado de fosforilación de las proteínas efectoras LIMK1 y Cofilina, a partir de muestras de células SK-N-SH transfectadas con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble*. Estudiamos el estado de fosforilación de dichas proteínas por Western Blot.

En estos experimentos y en las siguientes secciones, se utilizó a la proteína L-Lactato Deshidrogenasa (LDH) como control de carga ya que la misma presenta altos niveles de expresión en el citoplasma celular y no está relacionada con el citoesqueleto.

En las condiciones evaluadas, no se observaron diferencias en de los niveles de fosforilación de LIMK1 (Figura R10) ni de Cofilina (Figura R11).

Western Blot pLIMK1 y LIMK1

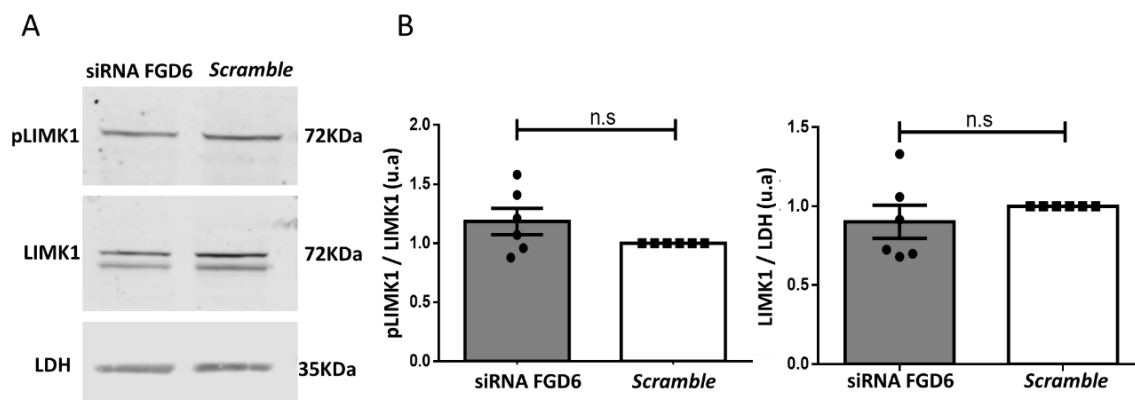


Figura R10 La disminución en los niveles de FGD6 no altera los niveles de fosforilación de LIMK1.

A- Western Blot de las proteínas pLIMK, LIMK total y L-Lactato Deshidrogenasa (LDH). Se obtuvieron extractos de proteínas a partir de células transfectadas con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble*, y se analizaron por SDS-PAGE. Se muestra una imagen representativa.

B- Cuantificación de los ensayos de Western Blot. A la derecha, cuantificación de la relación de pLIMK sobre la cantidad LIMK total y, a la izquierda, LIMK total normalizada a los valores obtenidos para la proteína LDH utilizada como control de carga. Los valores están expresados como la media \pm SEM de seis experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con Paired T-test con la corrección de Wilcoxon. n.s: No hay diferencias significativas entre tratamientos.

Western Blot pCofilina y Cofilina

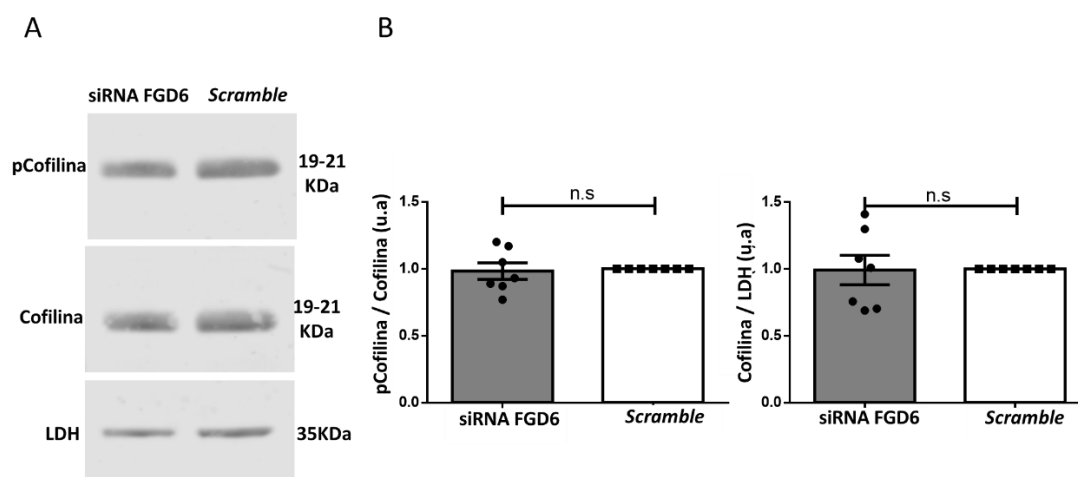


Figura R11 La disminución en los niveles de FGD6 no altera los niveles de fosforilación de Cofilina.

A- Western Blot de las proteínas pCofilina, Cofilina total y L-Lactato Deshidrogenasa (LDH). Se obtuvieron extractos de proteínas a partir de células transfectadas con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble*, y se analizaron por SDS-PAGE. Se muestra una imagen representativa.

B- Cuantificación de los ensayos de Western Blot. A la derecha, cuantificación de la relación de pCofilina sobre la cantidad Cofilina total y, a la izquierda, Cofilina total normalizada a los valores obtenidos para la proteína LDH utilizada como control de carga. Los valores están expresados como la media \pm SEM de siete experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con Paired T-test con la corrección de Wilcoxon. n.s: No hay diferencias significativas entre tratamientos.

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta sección nos permitieron concluir que la inhibición parcial de FGD6 no afectaría los estados de fosforilación de LIMK1 ni de Cofilina, implicadas en la regulación de la extensión de los filamentos de actina y el *turnover* de las subunidades del filamento.

2.3.2 La disminución en la expresión de FGD6 produjo una disminución específica de los niveles proteicos de la subunidad Arp2 del complejo Arp2/3

El complejo Arp2/3 es uno de los principales efectores río abajo de Rac1, actuando como nucleador de los filamentos de actina e iniciando la ramificación de mismos (Rouiller et al., 2008) (revisado en Heasman y Ridley, 2008). Se ha descrito que este complejo es el blanco final de muchos caminos de señalización que afectan la movilidad y la forma celular (revisado en Higgs y Pollard, 2001), está compuesto por las proteínas Arp2 y Arp3 (las cuales se relacionan con monómeros de actina) y otras cinco subunidades (Arpc1-5) (Rouiller et al., 2008). La mayoría de los datos estructurales y bioquímicos reportados

indican que cuando el complejo Arp2/3 está activado, las subunidades Arp2 y Arp3 interactúan como un heterodímero que forma la plantilla para el ensamblaje de un nuevo filamento de actina (revisado en Goley y Welch, 2006). Dado que las subunidades Arp2 y Arp3 son los principales actores del complejo nucleador decidimos analizar a ambas proteínas en esta sección de experimentos.

Para ello, a partir de muestras de células SK-N-SH transfectadas con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble* analizamos la expresión de Arp2 y Arp3 por Western Blot. Como muestra la figura R12, el silenciamiento de FGD6 no afectó la expresión de Arp3, dado que no se observan diferencias entre las células silenciadas (siRNA FGD6) con respecto a los controles (*Scramble*).

Western Blot de Arp3

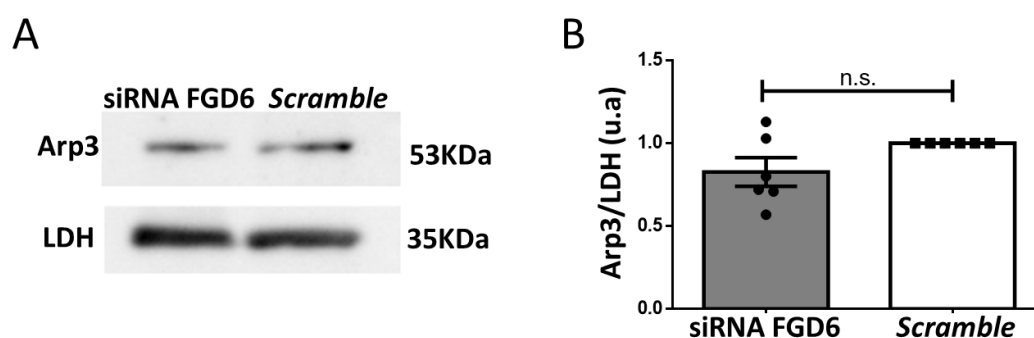


Figura R12 La disminución en los niveles de FGD6 no afecta la expresión de la proteína Arp3.

A- Western Blot de las proteínas Arp3 y L-Lactato Deshidrogenasa (LDH). Se obtuvieron extractos de proteínas a partir de células transfectadas con siRNA FGD6 secuencias *Scramble*, y se analizaron por SDS-PAGE. Se muestra una imagen representativa.

B- Cuantificación de los ensayos de Western Blot. Los valores están expresados como la media \pm SEM de seis experimentos independientes. Los valores fueron normalizados a los valores obtenidos para la proteína LDH utilizada como control de carga. El análisis estadístico se realizó con Paired T-test con la corrección de Wilcoxon. n.s: No hay diferencias significativas entre tratamientos.

Sin embargo, la reducción en la expresión de FGD6 resultó en una disminución significativa de aproximadamente el 30% de los niveles de proteína de Arp2 (Figura R13 A).

La actividad del complejo Arp2/3 puede ser regulada de diversas maneras. Los factores promotores de la nucleación inducen un cambio conformacional que, como resultado, activa al complejo Arp2/3 (Goley et al., 2004). Por otro lado, en neuronas, se ha

reportado que la actividad del complejo Arp2/3 también puede estar regulada tanto a nivel transcripcional (Lippi et al., 2011; Tang et al., 2016) como a nivel post-traducciona (Narayanan et al., 2011). Dado que el silenciamiento de FGD6 produjo una disminución en la expresión de Arp2, decidimos evaluar en estas condiciones los niveles de expresión del ARNm de Arp2. Para ello, a partir de células SK-N-SH transfectadas con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble* se obtuvo el ARNm y se cuantificaron los valores de expresión del ARNm de Arp2 por medio de RT-qPCR. Como muestra la Figura R13 B, la disminución en la expresión de FGD6 no afectó los niveles de expresión del gen de Arp2.

Western Blot de Arp2

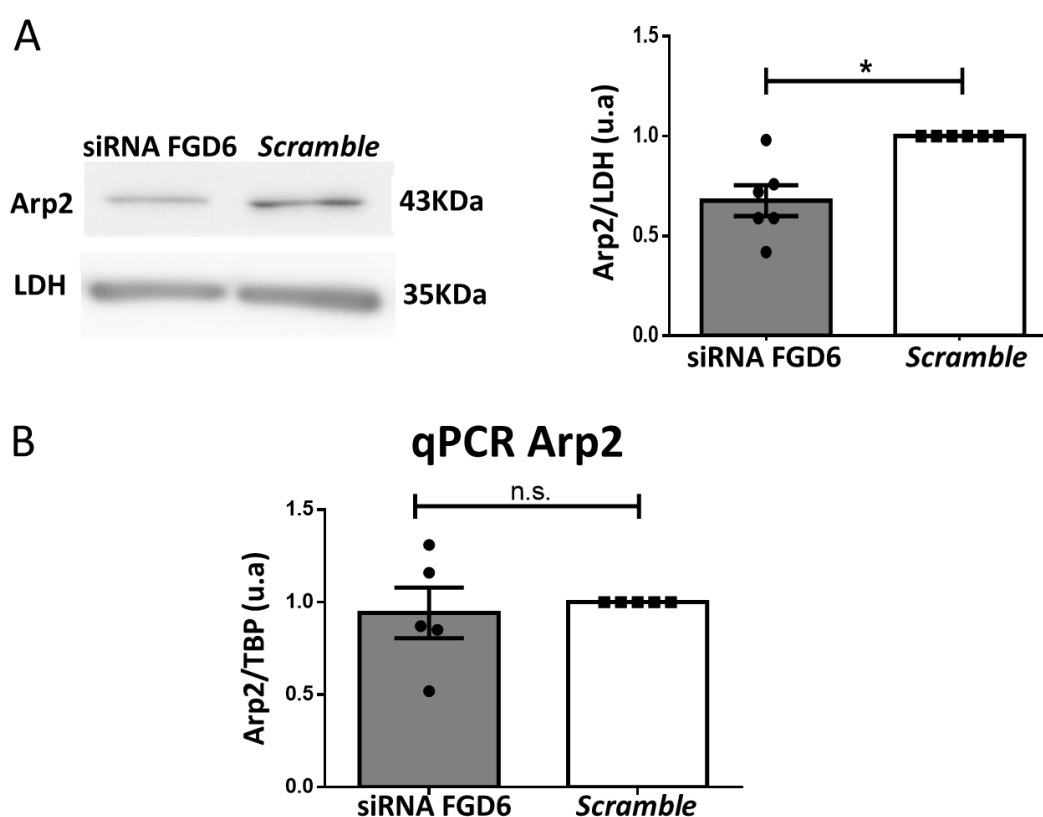


Figura R13 La disminución en los niveles de FGD6 produce una disminución en la expresión de la proteína Arp2, sin alterar los niveles de su ARNm.

A- Western Blot de las proteínas Arp2 y L-Lactato Deshidrogenasa (LDH). Se obtuvieron extractos de proteínas a partir de células trasfectadas con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble*, y se analizaron por SDS-PAGE. Panel izquierdo: Se muestra una imagen representativa. Panel derecho: Cuantificación de los ensayos de Western Blot. Los valores están expresados como la media \pm SEM de seis experimentos independientes. Los valores fueron normalizados a los valores obtenidos para la proteína LDH utilizada como control de carga. El análisis estadístico se realizó con Paired T-test con la corrección de Wilcoxon. * $p \leq 0,05$.

B-Los niveles de ARNm de Arp2 fueron determinados mediante RT-qPCR. Los valores están expresados como la media \pm SEM de cinco experimentos independientes, los valores fueron normalizados a los valores obtenidos en las células transfectadas con secuencias *Scramble*. El análisis estadístico se realizó con Paired T-test con la corrección de Wilcoxon. n.s: No hay diferencias significativas entre tratamientos.

Estos resultados, en conjunto, nos permitieron concluir que el silenciamiento de FGD6 produce una disminución específica de la expresión de la subunidad Arp2 del complejo nucleador de actina Arp2/3, sin alterar los niveles de su ARNm. Por lo tanto, en las condiciones evaluadas, la regulación de la subunidad Arp2 sería post traduccional. Esta regulación post traduccional podría estar directamente mediada por FGD6 o podría ser regulada indirectamente a través de factor(es) no conocido(s).

2.4 La interferencia en la expresión de FGD6 produjo alteraciones morfológicas en las células y una disminución drástica de los filamentos de actina, sin cambios en el contenido total de actina G

Como se mencionó anteriormente, en el SNC, Rac1 y Cdc42 activan cascadas de señalización que terminan regulando la polimerización/ despolimerización de los filamentos de actina. Dado que la disminución en la expresión de FGD6 produjo un aumento en la actividad basal de Rac1 y una disminución en los niveles proteicos de Arp2 (subunidad del complejo Arp2/3 que une a los filamentos de actina e inicia la ramificación de los mismos), nos preguntamos si en estas condiciones se vería afectada la organización del citoesqueleto de actina.

Para este fin, transfectamos células SK-N-SH con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble*, y evaluamos la organización de los filamentos de actina mediante la tinción con faloidina conjugada a rodamina. La faloidina es una molécula que se une con alta afinidad a la actina F, por lo cual es un excelente marcador para evaluar el citoesqueleto de actina. En el caso de las células SK-N-SH transfectadas con secuencias *Scramble*, la inmunofluorescencia para FGD6 mostró que la proteína se distribuyó en forma homogénea en todo el citoplasma de las células (Figura R14, panel superior izquierdo). En estas condiciones, la tinción de los filamentos de actina mostró que los mismos se distribuyen en forma homogénea en el citoplasma celular con una marcación más intensa de actina F en la membrana plasmática y, evidenciando, además, la morfología

característica de esta línea celular (Figura R14, panel inferior izquierdo). Sin embargo, en aquellas células donde FGD6 fue silenciado parcialmente, se observó una disminución drástica de la intensidad de fluorescencia de FGD6 acorde al silenciamiento (Figura R14, panel superior derecho) que, además, se acompañó con una marcada disminución en la tinción con faloidina de los filamentos de actina. Asimismo, las células silenciadas presentaron alteraciones en su morfología, algunas células mostraron una morfología más alargada (Figura R14, panel inferior derecho, flechas turquesas) mientras que otras exhibieron un tamaño mayor al habitual (Figura R14, panel inferior derecho, flechas blancas).

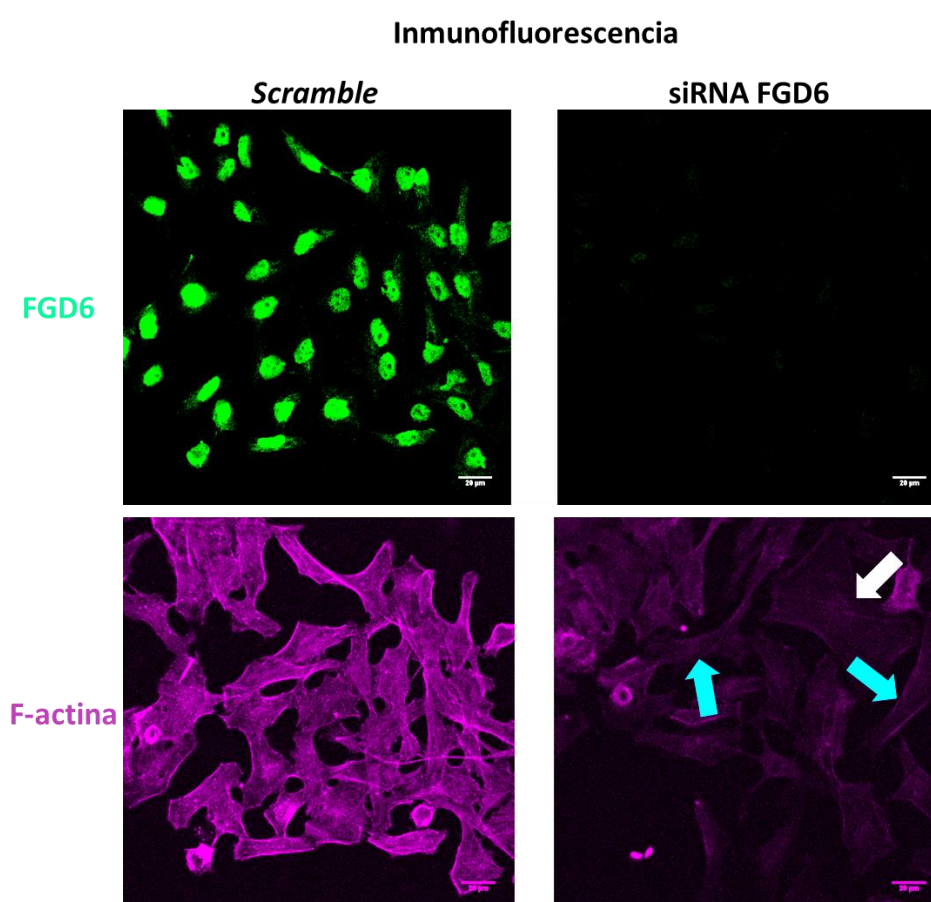


Figura R14 La disminución en los niveles de expresión de FGD6 afecta la morfología celular y la organización de los filamentos de actina. Células SK-N-SH transfectadas con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble*, fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo anti-FGD6 (verde), faloidina (magenta) y el correspondiente anticuerpo secundario. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss- LSM 510 META, analizadas con el programa del LSM y el software ImageJ. Barra de escala, 20 μ m. La marcación con faloidina evidenció, en las células en las que FGD6 fue silenciado parcialmente, alteraciones morfológicas tales como: tamaño mayor al esperado (flechas blancas) o una morfología más alargada (flechas turquesas) mientras que en células transfectadas con secuencias *Scramble* evidenciaron la morfología característica de la línea celular SK-N-SH.

Dado que la interferencia de FGD6 produjo una disminución drástica de la marca de los filamentos de actina decidimos evaluar si dicha alteración se relacionaba con un impacto sobre el “pool” total de actina. Para ello, realizamos ensayos de Western Blot para determinar los niveles de actina total.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R15, donde se evidencia que las células silenciadas para FGD6 no presentaron diferencias significativas de los niveles de actina total con respecto a los niveles observados en las células control.

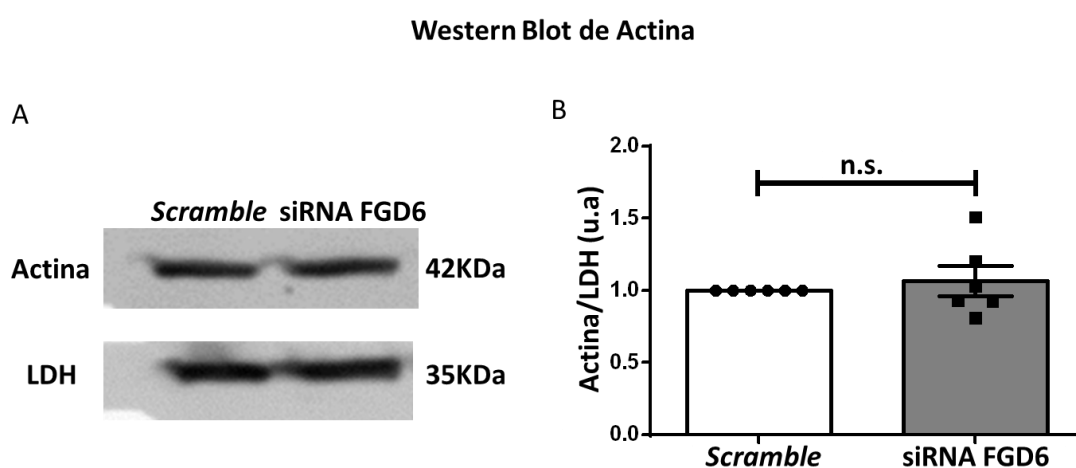


Figura R15 La disminución en los niveles de FGD6 no afecta el contenido total de actina.

A- Western Blot de actina total y L-Lactato Deshidrogenasa (LDH). Se obtuvieron extractos de proteínas a partir de células trasfectadas con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble*, y se analizaron por SDS-PAGE. Se muestra una imagen representativa.

B- Cuantificación de los ensayos de Western Blot. Los valores están expresados como la media \pm SEM de seis experimentos independientes. Los valores fueron normalizados a los valores obtenidos para la proteína LDH utilizada como control de carga. El análisis estadístico se realizó con Paired T-test con la corrección de Wilcoxon. n.s: No hay diferencias significativas entre tratamientos.

En conjunto, estos resultados sugirieron que la disminución en los niveles del ARNm de FGD6 afectaría la formación/ ramificación de los filamentos de actina, sin modificar el contenido total de actina.

2.5 El silenciamiento parcial de FGD6 no afectó la dinámica de actina

Las Rho GTPasas Rac1 y Cdc42 regulan la morfología celular y la reorganización del citoesqueleto de actina (revisado en Hall, 1998). Se ha reportado que una vez activadas, las Rho GTPasas interactúan y regulan la actividad de las proteínas efectoras del

citoesqueleto. Estos efectores impactan directa o indirectamente en el ensamblado y el desacoplado local de la actina F (Sit y Manser, 2011). Dado que, la inhibición parcial de FGD6 afectó la morfología celular y la organización de los filamentos de actina nos preguntamos si, en estas condiciones, se vería afectada la dinámica de la actina, es decir, el contenido de actina G y actina F.

Para responder a esta pregunta y determinar si la inhibición parcial de FGD6 afectaba la cantidad de actina filamentosa (actina F) frente al contenido de actina globular libre (actina G) transfectamos células SK-N-SH con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble* y, evaluamos por Western Blot las fracciones celulares de actina F y actina G. Brevemente, las fracciones celulares de actina F y actina G fueron obtenidas empleando *buffers* que permitieron una solubilidad diferencial de las mismas para ser aisladas por centrifugación. Como muestra la Figura R16, en las condiciones evaluadas, no se observaron diferencias significativas en la proporción de actina F incorporada en el citoesqueleto frente a la actina G que se encuentra libre en el citosol.

Western Blot Actina F / Actina G

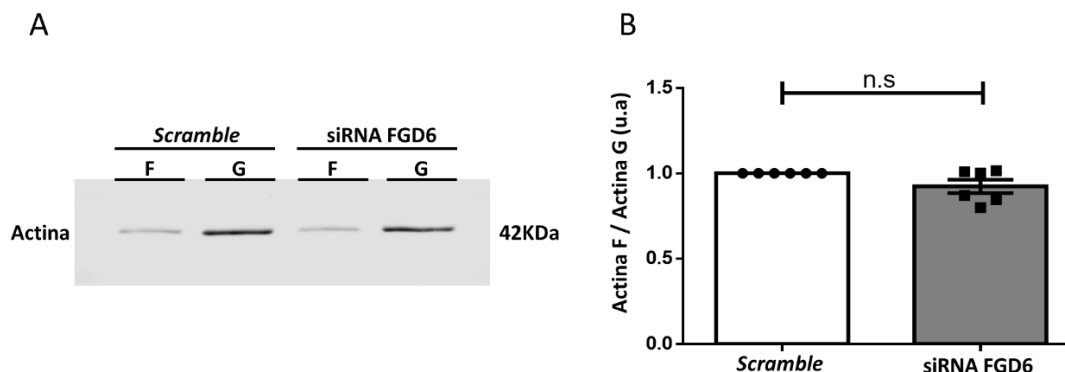


Figura R16 La disminución en los niveles de FGD6 no afecta la dinámica de la actina.

A- Western Blot de las fracciones celulares de actina F y actina G. Células SK-N-SH trasfectadas con siRNA FGD6 o secuencias *Scramble*, fueron homogeneizadas en un *buffer* de estabilización de actina F, seguido de centrifugación para separar la actina F de la reserva de actina G. La separación de actina F de actina G se logró porque la actina F es insoluble (pellet) en este *buffer*, mientras que la actina G es soluble (sobrenadante). A continuación, el sobrenadante de actina G se transfirió a un tubo nuevo y el pellet de actina F fue resuspendido en un segundo *buffer*, que permitió la conversión de actina F en actina G. Finalmente, la muestra fue centrifugada y se transfirió el sobrenadante (actina G proveniente de la actina F) a un tubo nuevo. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE. Se muestra una imagen representativa.

B- Cuantificación de los ensayos de Western Blot. Los valores están expresados como la media \pm SEM de seis experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con Paired T-test con la corrección de Wilcoxon. n.s: No hay diferencias significativas entre tratamientos.

Este resultado nos permitió concluir que la inhibición parcial de FGD6 no afecta la dinámica de polimerización / despolimerización de los filamentos de actina.

3- ANÁLISIS DE FGD6 EN LA EPILEPSIA FOCAL AUTOLIMITADA DE LA INFANCIA

Se ha reportado que la epilepsia es la sexta causa más común de discapacidad neurológica, afectando a personas de todas las edades en todo el mundo (GDB, 2019). En nuestro país, se ha estimado su prevalencia en 6,2 casos cada 1000 habitantes (Melcon et al., 2007). Actualmente, la epilepsia es considerada un conjunto de enfermedades con síntomas similares, siendo frecuentes las convulsiones espontáneas (revisado en Fisher et al., 2014; Falco-Walter, 2020). Extensas evidencias han puesto de manifiesto que las terapias vigentes están dirigidas exclusivamente a disminuir la posibilidad de la aparición de los síntomas, pero no abordan la causa de los distintos tipos de epilepsia, dado que la etiología de la enfermedad es muy diversa y, en la gran mayoría de los casos, desconocida (revisado en McTague et al., 2016; Symonds et al., 2017; Perruca et al., 2018).

En lo que respecta a la población pediátrica, se ha demostrado que los síndromes epilépticos asociados a lesiones cerebrales difusas conllevan convulsiones diarias que cuando no son propiamente tratadas generan inevitablemente discapacidades asociadas a retraso mental (Sánchez-Carpintero, 2010) (revisado en Schuele y Lüders, 2008; Robinson, 2012). Las Epilepsias Focales Autolimitadas de la Infancia o SFEC (por sus siglas en inglés) son el síndrome epiléptico más prevalente en la población pediátrica. El espectro de síndromes establecidos dentro de las SFEC se ha caracterizado por convulsiones de origen focal, sin una anomalía detectable a nivel de estructura cerebral (Rudolf et al., 2020). El término SFEC se ha utilizado para los pacientes que sufren de epilepsia focal durante las primeras 2 décadas de vida y que frecuentemente remiten durante la edad adulta (Scheffer et al., 2017).

Recientemente, Casalia y colaboradores (2021), han realizado un estudio de secuenciación del exoma completo de dos pacientes de una familia de 7 miembros, 4 afectados por una SFEC (Figura R17 A). De 47 genes con variantes consistentes con un modelo recesivo de patología, sólo la mutación puntual en homocigosis en FGD6 en la posición 827 A>G que se encuentra en el exón 2 mostró segregación perfecta en los pacientes con esta dolencia (Figura R17 B). La mutación 827 A>G provoca un cambio de glutámico por glicina en la proteína resultante en la posición 276 (p.E276G) que se encuentra en la región de baja complejidad estructural (Figura R17 C). De esta manera

identificaron una mutación en el gen que codifica para la proteína FGD6 como probable causa del síndrome epiléptico recurrente en este grupo familiar. Este grupo de investigación logró, a partir de los fibroblastos de estos pacientes y sus familiares, derivar y reprogramar estas células a células madre pluripotentes inducidas (hiPS) que luego fueron diferenciadas a neuroepitelio (NE). Además, reportaron que, en comparación con dos controles familiares heterocigotas para la mutación, las neuronas de los pacientes mostraron una longitud axonal más corta, una reducción dramática en los niveles de sinapsina-1 y alteraciones en la actividad electrofisiológica (Casalia et al., 2021).

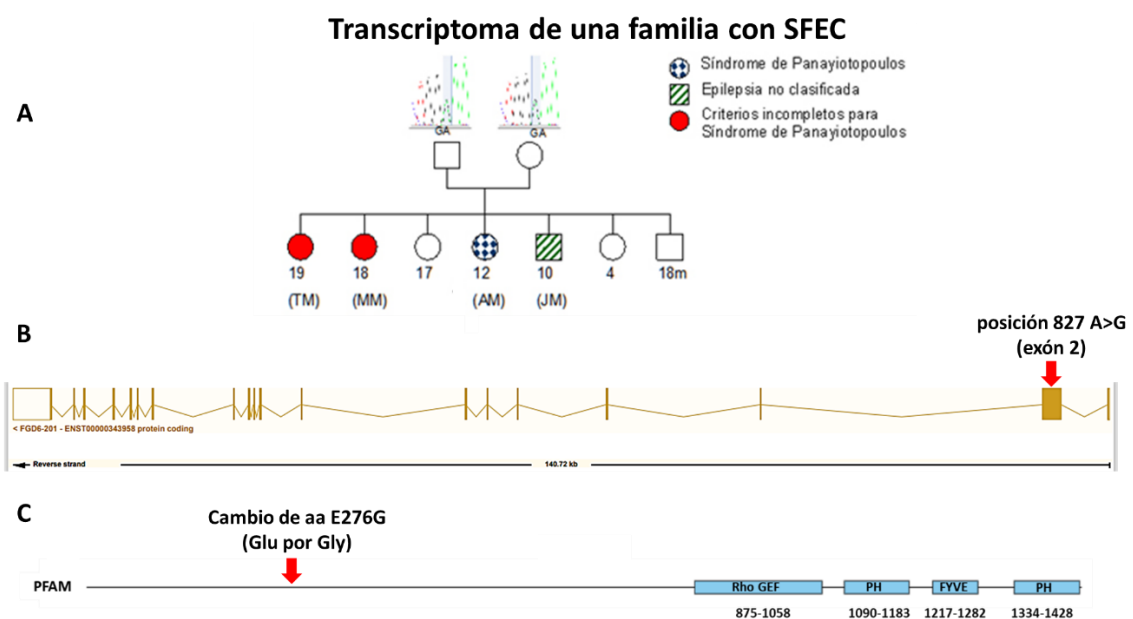


FIGURA R17 Identificación de la mutación puntual en homocigosis en FGD6 en la posición 827 A>G (p.E276G) como probable causa del síndrome epiléptico recurrente en este grupo familiar.

A- Esquema de la familia afectada. En color se destacan los miembros con diagnóstico de Epilepsia.

B- Esquema del transcrito de FGD6 donde se muestra la mutación en la posición 827 A>G (flecha roja).

C- Esquema de FGD6 donde se muestran los dominios estructurales característicos de la familia FGD (PFAM) y se marca la ubicación de la mutación p.E276G (flecha roja).

Panel A tomado de Casalia et al., *Stem Cell Res Ther*, 2021.

Teniendo en cuenta los resultados presentados en la sección 2 del presente trabajo de Tesis, nos preguntamos si la mutación p.E276G en FGD6 afectaba la organización del citoesqueleto de actina. Con el fin de investigar las implicancias la mutación p.E276G en FGD6 sobre el citoesqueleto de actina, en esta sección, trabajamos con fibroblastos provenientes de sujetos *wild type*, heterocigotas y homocigotas para la mutación en

FGD6 como así también con células hiPS generadas a partir de los grupos de fibroblastos mencionados anteriormente, las cuales fueron cedidas gentilmente por el Dr. Pitossi, jefe del laboratorio de Terapias Regenerativas y Protectoras del Sistema Nervioso Central, Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET. En la presente sección trabajamos entonces con tres grupos:

FGD6^{A/A}*(wt): FGD6 *wild type*.

FGD6^{A/G}*(het): FGD6 con la mutación p.E276G en heterocigosis.

FGD6^{G/G}*(mut): FGD6 con la mutación p.E276G en homocigosis.

*En la nomenclatura utilizamos A y/o G en referencia a la base afectada en el ADN.

3.1 El Neuroepitelio generado a partir de hiPS de pacientes con SFEC presentó una acumulación anómala de FGD6 en el citoplasma y la membrana plasmática

Para comenzar a analizar el efecto de la mutación p.E276G en FGD6, diferenciamos las células hiPS provenientes de sujetos FGD6^{A/A}, FGD6^{A/G} y FGD6^{G/G} a neuroepitelio (NE) con un protocolo desarrollado en el laboratorio del Dr. Pitossi (Casalia et al., 2021) (Figura R18). Luego de 10 semanas de diferenciación, las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-FGD6 y se analizó la expresión de la proteína por inmunofluorescencia.

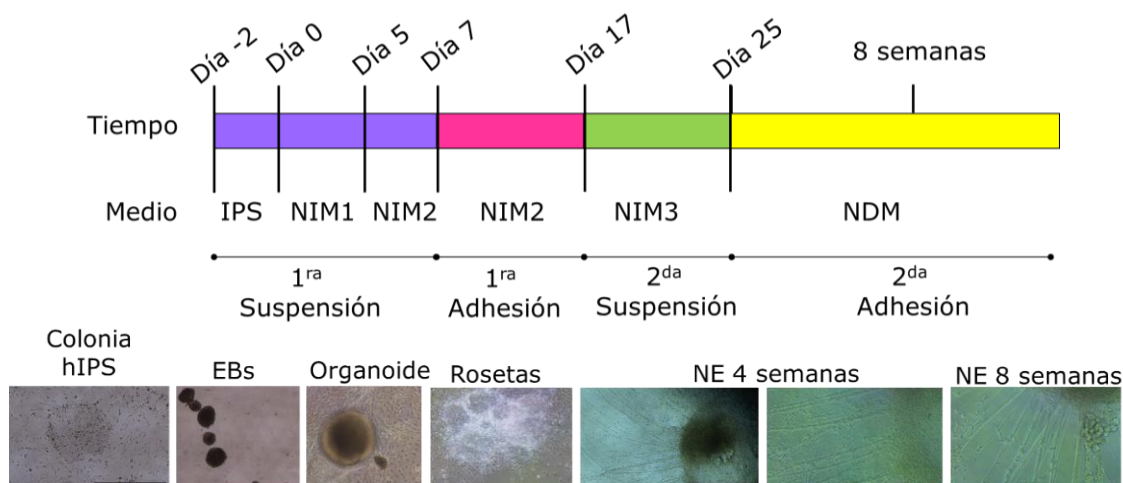


Figura R18 Protocolo de diferenciación de Neuroepitelio (NE). A partir de fibroblastos de FGD6^{A/A}, FGD6^{A/G} y FGD6^{G/G}, se generaron hiPS que se diferenciaron a NE. Luego de 10 semanas de diferenciación, se analizó la expresión de FGD6. Se muestran imágenes representativas de cada condición experimental. Barra de escala, 1 mm.

Las imágenes obtenidas mostraron la expresión de la proteína en neuronas de los tres grupos experimentales de NE (Figura R19). En las células con $FGD6^{A/A}$ y $FGD6^{A/G}$, $FGD6$ presentó una distribución celular homogénea en el citoplasma mientras que las células con $FGD6^{G/G}$ evidenciaron una acumulación de la proteína perinuclear y en la membrana plasmática (Figura R19). Asimismo, las células del NE que presentaban $FGD6^{G/G}$ evidenciaron una morfología más epitelial con respecto a la observada en las células del NE con $FGD6^{A/A}$ y $FGD6^{A/G}$.

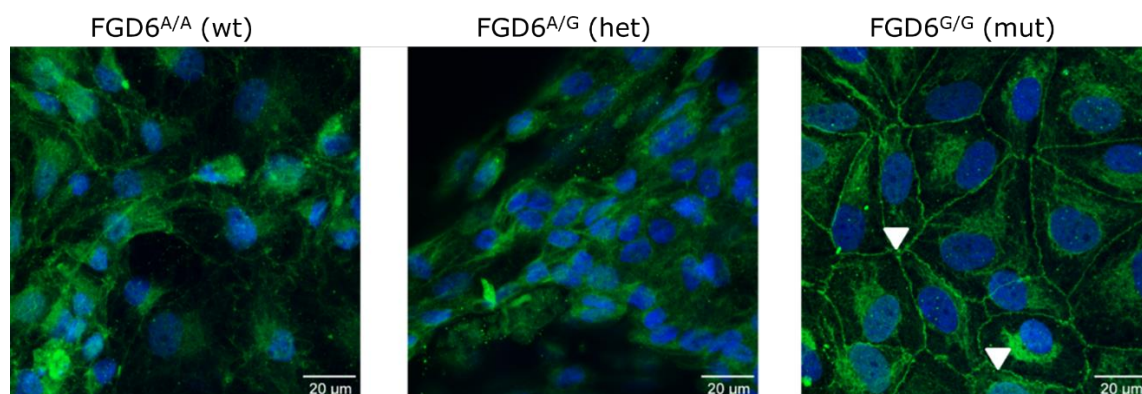


Figura R19 Expresión de $FGD6$ en un cultivo de NE de 10 semanas. Las células fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo anti- $FGD6$ (verde), Hoechst-33258 (núcleos) y el correspondiente anticuerpo secundario. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss- LSM 510 META, analizadas con el programa del LSM y el software ImageJ. Barra de escala, 20 μm . En las células del NE que presentan $FGD6^{A/A}$ (wt) y $FGD6^{A/G}$ (het), $FGD6$ muestra una distribución celular homogénea mientras que en células de NE con $FGD6^{G/G}$ (mut) evidencian una acumulación de la proteína perinuclear y en la membrana plasmática (punta de flecha).

3.2 Los fibroblastos con $FGD6^{G/G}$ presentaron el citoesqueleto de actina alterado

Como se describió en la sección anterior, las células de NE con $FGD6^{G/G}$ presentaron una distribución celular de $FGD6$ alterada en comparación con las células de NE con $FGD6^{A/A}$ y $FGD6^{A/G}$. Asimismo, la mutación p.E276G en homocigosis $FGD6$, consistente con un modelo recesivo de patología, mostró una segregación perfecta en pacientes con SFEC. Estas observaciones nos sugirieron que la función de $FGD6$ podría estar alterada y por ello, decidimos evaluar el citoesqueleto de actina.

Este estudio se realizó en fibroblastos de sujetos $FGD6^{A/A}$, $FGD6^{A/G}$ y $FGD6^{G/G}$ para poder obtener un análisis adecuado del citoesqueleto de actina. Para este fin, las células fueron fijadas y marcadas con faloidina conjugada a rodamina (sonda de alta afinidad

para actina F). Los estudios del citoesqueleto mostraron que, en fibroblastos que presentan FGD6^{G/G} la tinción de los filamentos de actina era menos intensa y parecían presentar una desorganización de los mismos en comparación con los fibroblastos FGD6^{A/A} (Figura R20).

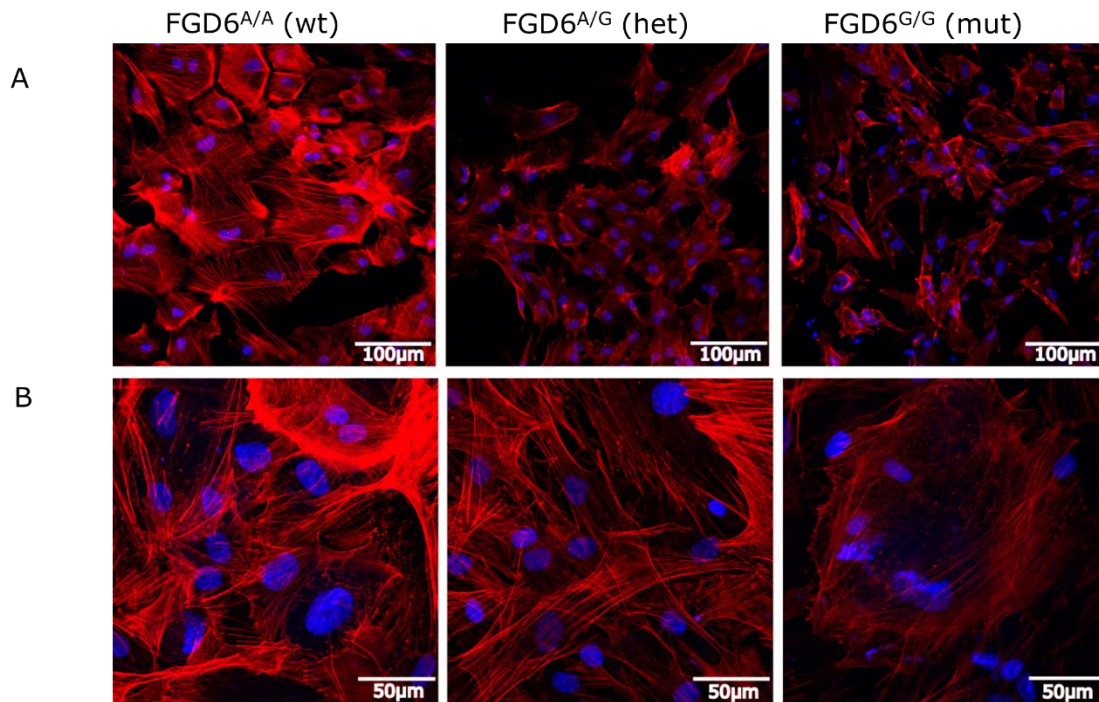


Figura R20 Análisis del citoesqueleto de actina en fibroblastos FGD6^{A/A}, FGD6^{A/G} y FGD6^{G/G}. Las células fueron fijadas e incubadas con faloidina (rojo) y Hoechst-33258 (núcleos). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss- LSM 510 META, analizadas con el programa del LSM y el software ImageJ. A y B Imágenes obtenidas a diferentes magnificaciones. Barras de escala, A=100 µm, B= 50µm. En fibroblastos con FGD6^{G/G} (mut) la tinción de los filamentos de actina es menos intensa y parecería haber una desorganización de los mismos en comparación con los fibroblastos con FGD6^{A/A} (wt).

Estos resultados obtenidos mostraron cierta similitud a lo observado en los experimentos de silenciamiento en las células de neuroblastoma SK-N-SH, en donde la interferencia parcial de FGD6 por medio de un conjunto de siRNAs específicos produjo una disminución drástica de la marca de los filamentos de actina. Esta observación nos sugirió que la mutación p.E276G en homocigosis podría provocar pérdida o disminución de la función de FGD6.

Las diferencias encontradas en la localización celular de FGD6 entre los distintos grupos y los resultados obtenidos del análisis del citoesqueleto de actina en los fibroblastos

acompañan a la hipótesis de que la proteína mutada puede haber perdido o disminuido su función. Así, la mutación descrita altera la localización celular de FGD6 y afecta el citoesqueleto de actina. Los resultados obtenidos en esta sección, sumados a los descritos con el silenciamiento de FGD6, sugieren que la mutación p.E276G en FGD6 podría impactar la diferenciación y actividad neuronal alteradas previamente reportadas (Casalia et al., 2021) posiblemente contribuyendo a la fisiopatología de las SFEC.

Discusión

DISCUSIONES GENERALES

FGD6 pertenece a una familia de proteínas con una organización estructural que le permitiría mediar entre las señales provenientes de la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina. Recientemente se describió una asociación estrecha de FGD6 con el citoesqueleto de actina y con diversos componentes de las vías de señalización de Cdc42 y Rac1, Rho GTPasas que tienen un papel clave en la regulación de la fisiología neuronal. Sin embargo y a pesar de que FGD6 se expresa en neuronas, hasta el presente no hay evidencia disponible en referencia a su posible acción en el Sistema Nervioso Central.

En este trabajo caracterizamos *in silico* el extremo N-terminal de FGD6, el cual posee una región intrínsecamente desordenada (IDR), con mayor probabilidad de interactuar con otros dominios/ proteínas ordenadas y con numerosos potenciales sitios de fosforilación en la región adyacente. Describimos por primera vez que la expresión de FGD6 se encuentra finamente regulada en las neuronas y que su inhibición afecta vías intracelulares que impactan en el citoesqueleto de actina, pudiendo así alterar la función celular. Los resultados presentados en esta Tesis permiten además comenzar a esclarecer el mecanismo por el cual FGD6 modula algunas vías de señalización de Rac1, pudiendo ser de manera directa y/o indirecta, a través de factor(es) que interacciona(n) con los distintos componentes de las mismas. Finalmente, los hallazgos obtenidos ayudan a comprender la posible contribución de FGD6 a la fisiopatología de enfermedades neurológicas como la SFEC.

1. CARACTERIZACIÓN DE FGD6: ANÁLISIS DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA Y EXPRESIÓN DEL GEN DURANTE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL

En una primera instancia estudiamos *in silico* la estructura terciaria de la proteína. FGD6 es una proteína multidominio que posee una región N-terminal con características de región intrínsecamente desordenada (IDR) y una región C-terminal ordenada que posee los dominios estructurales característicos de los activadores (GEFs) de las Rho GTPasas (revisado en Nakanishi y Takai., 2008; Eitzen et al., 2019). La región N-terminal presentó mayor probabilidad de interactuar con otros dominios/proteínas ordenadas entre las posiciones aminoacídicas 760 y 880 (IDR); y tenía reportados numerosos sitios putativos

de fosforilación en la región adyacente a la zona antedicha. Las Rho GTPasas tienen un papel fundamental en la remodelación del citoesqueleto de actina, necesario para una correcta función neuronal, participando en la morfogénesis dendrítica, formación de espinas dendríticas y en la generación y guía de axones (revisado en Kalpachidou et al., 2019). Las características estructurales de FGD6 le permitirían actuar como un modulador central en las vías de señalización del citoesqueleto de actina, interactuando putativamente con otros reguladores implicados en la reorganización del mismo y con la actina. Esta idea se ve favorecida por reportes previos donde está ampliamente descrito que tanto las IDR de proteínas multidominio como las proteínas reguladoras de actividad de las Rho GTPasas, pueden actuar como proteínas *scaffold* o “adaptadores” funcionando como ejes centrales en las vías de señalización (Kim et al., 2008; Müller et al., 2020) (revisado en Dunker et al., 2005).

Nuestros primeros análisis indican que la proteína FGD6 presenta 12 sitios potenciales de fosforilación reportados ubicados en una región acotada (comprendida entre los aminoácidos 515 y 760) que, además, es la secuencia adyacente a la región intrínsecamente desordenada de la proteína (secuencia aminoacídica comprendida entre las posiciones 760 y 880). Ha sido descrito que las proteínas de señalización presentan, en su gran mayoría, secuencias autoinhibitorias enriquecidas en regiones desordenadas, contienen múltiples sitios de fosforilación y amplia variabilidad estructural; garantizando de esta manera un control fino de su activación (Trudeau et al., 2013). De esta manera, las fosforilaciones reportadas para FGD6 podrían estar implicadas en cambios conformacionales de la proteína, pudiendo regular una autoinhibición y/o interacción con otras proteínas. Esta observación va en concordancia con lo descrito por Steenblock y colaboradores (2014) en osteoclastos, en los cuales, cuando FGD6 tiene truncada su región N-terminal la fosforilación en tirosinas inducida por Src se pierde junto con una pérdida en su actividad, lo que sugiere que esta región podría ser potencialmente necesaria para regular su unión a otras proteínas y su función.

Asimismo, la mayoría de los reguladores Rho GEF presentan autoinhibición debido a interacciones intramoleculares entre el dominio catalítico y los dominios adyacentes, lo que impide su interacción con los sustratos (Mitin et al., 2007; Rojas et al., 2007)

(revisado en Cherfils y Zeghouf, 2013). Así, en la proteína Vav1 (Rho GEF ampliamente caracterizado que posee una estructura de dominios similar a la de FGD6), el dominio funcional DH presenta interacciones intramoleculares con un dominio ácido adyacente, y a su vez, estas interacciones son estabilizadas por los dominios PH. Esta autoinhibición se alivia mediante la fosforilación de tirosinas en el dominio ácido (Aghazadeh et al., 2000; Yu et al., 2010). Dado que FGD6 también contiene grupos ácidos adyacentes al dominio DH (revisado en Eitzen et al., 2019), y numerosos sitios potenciales de fosforilación en tirosinas en la secuencia adyacente a la región IDR de la proteína (en particular las tirosinas Y748, Y754 y Y760), podríamos especular un mecanismo autoinhibidor similar al de Vav1, y que podría ser activada por quinasas aunque no podemos descartar otros mecanismos de activación. Estas características podrían permitir a FGD6 regular finamente su interacción con otras regiones/ proteínas ordenadas como está reportado para otras proteínas con características similares (revisado en Wright y Dyson, 2015).

Hasta el momento, no se ha reportado ni caracterizado la función de FGD6 en el Sistema Nervioso Central. Por lo tanto, en una primera aproximación, evaluamos la expresión de la misma durante la diferenciación neuronal *in vitro*. Nuestros resultados mostraron que, tanto en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH como en neuronas corticales de cultivos primarios de rata, a medida que progresa la diferenciación neuronal la expresión de FGD6 disminuye significativamente y en estadios más maduros tiende a volver a aumentar hasta los valores observados al inicio de este proceso celular. Está ampliamente descrito que los genes que varían su expresión durante el proceso de diferenciación celular se utilizan normalmente como marcadores de este proceso biológico (Evseenko et al., 2010; Yung et al., 2011; Kim et al., 2014). Recientemente, se reportó que los genes regulados dinámicamente durante la diferenciación neuronal generalmente cumplen funciones relacionadas al desarrollo, apoyando la idea de que no sólo son marcadores de diferenciación, sino que también podrían desempeñar funciones importantes en momentos específicos de este proceso celular y que, además, los mismos están conservados entre ratones y humanos (Ando et al., 2015). Asimismo, Gurok y colaboradores (2004) estudiaron cambios en la expresión génica en el curso de la diferenciación de células progenitoras neurales y describieron diez grupos de genes

cuya expresión es variable durante la diferenciación neuronal. Uno de esos grupos de genes está involucrado con los cambios morfológicos y relacionado con el citoesqueleto de actina. Se ha reportado que FGD6 está asociado al citoesqueleto de actina (Müller et al., 2020) y además interacciona directa o indirectamente con Rho GTPasas involucradas en la remodelación del citoesqueleto (Steenblock et al., 2014; Thongnak et al., 2018; Matsuda et al., 2022; resultados de esta Tesis). Estas observaciones junto a los resultados discutidos en esta sección son consistentes con la hipótesis de que FGD6 podría regular la remodelación del citoesqueleto de actina durante la diferenciación celular.

2. ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN CONDICIONES DE DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FGD6

Con el fin de investigar la función de FGD6 en las neuronas y evaluar su participación en las vías específicas que impactan en la dinámica del citoesqueleto de actina, se estableció un modelo de estudio con la expresión del gen FGD6 disminuida, como variable independiente, en células de neuroblastoma humano SK-N-SH transfectadas con un conjunto de ARN pequeños de interferencia específicos.

Los resultados presentados en esta Tesis revelaron que la inhibición parcial de FGD6 produjo una hiperactividad de Rac1. Este resultado fue inesperado ya que previamente en osteoclastos, se lo asoció por estructura y mediante un análisis de interactoma como GEF de Cdc42 (Steenblock et al., 2014). Por otro lado, recientemente Müller y colaboradores (2020) reportaron que en células HEK293T, FGD6 no tiene asociada actividad específica para ninguna de las Rho GTPasas canónicas RhoA, Rac1 y Cdc42 y que se encuentra asociado a actina en células MDKC (línea celular de riñón canino). Nuestros resultados van en concordancia con los reportes más recientes de FGD6, y nos permiten hipotetizar que en neuronas ésta proteína actuaría como *scaffold* interaccionando con regulador(es) de la actividad de Rac1. Las diferencias observadas entre diferentes sistemas celulares podrían deberse a que la función de FGD6 sea contexto específico. Finalmente, recientemente Matsuda y colaboradores (2022) reportaron que FGD6 está asociado a Rac1 activo, lo que refuerza la posible interacción con esta GTPasa. La hiperactividad de Rac1 descrita en este trabajo aporta nuevas

perspectivas en el estudio de desregulación de las Rho GTPasas ya que la mayor parte de los trabajos realizados en el Sistema Nervioso relacionados con la actividad de Rac1 hacen foco en la disminución/pérdida de la actividad de esta GTPasa (Duman et al., 2021). La hiperactividad de Rac1 en las redes neuronales ha sido poco estudiada, sin embargo, podría tener implicancias en el retraso intelectual como describen Zamboni y colaboradores (2018). Asimismo, Banka y colaboradores (2022) estudiaron 8 variantes *missense* de Rac1 que resultaban en la activación de esta Rho GTPasa y provocaban trastornos del desarrollo neuronal. Estas variantes no sólo aumentaban la actividad de Rac1, sino que sobreactivaban a los efectores WAVE/Arp2/3 ubicados río abajo de la vía de señalización, lo cual resultaba en una morfología neuronal anormal.

Está ampliamente caracterizado que la Rho GTPasa Rac1 activa una cascada de fosfo/desfosforilaciones que incluye a PAK, a LIMK y a Cofilina y, regula el *turnover* de los filamentos de actina (revisado en Heasman y Ridley, 2008). Los resultados obtenidos por FRET, donde la inhibición parcial de FGD6 resultó en un aumento de la actividad basal de Rac1 sugirieron que esta hiperactividad podría estar afectando el estado de fosforilación de LIMK1 y de Cofilina, entre otros. Sin embargo, la disminución en la expresión de FGD6 no produjo diferencias significativas en los niveles de fosforilación de ninguna de estas dos proteínas efectoras. Estudios recientes en un modelo murino sugieren que la hiperactividad de Rac1 por pérdida de uno de sus reguladores negativos (ArhGAP15) resulta en un aumento de Cofilina fosforilada debido una actividad aumentada de la vía que involucra a PAK y LIMK y una disminución en la fosfatasa SSH. Estos cambios están asociados a un retraso en el crecimiento axonal, una disminución en la arborización dendrítica, y alteración en la densidad sináptica; fenómenos todos que conducirían a fallas en el desarrollo intelectual (Zamboni et al., 2018). Estos autores trabajaron con un modelo murino de silenciamiento del gen sostenido en el tiempo. La ausencia de diferencias en los niveles de fosforilación de LIMK1 y de Cofilina observados la presente Tesis puede ser debida a que el silenciamiento de FGD6 fue realizado en forma transiente. Por lo tanto, no descartamos que una disminución sostenida en el tiempo en los niveles de FGD6 termine impactando en los niveles de fosforilación de estas proteínas efectoras en forma similar a lo descripto por Zamboni y colaboradores (2018). Asimismo, no podemos descartar que el efecto de la disminución de la expresión

de FGD6 puede estar enmascarado porque los análisis fueron realizados con un *pool* de células y la eficiencia de transfección no es del 100%.

Otro de los efectores de Rac1 evaluados en el presente trabajo fue el complejo nucleador de actina Arp2/3. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que al disminuir la expresión de FGD6 había una reducción significativa en los niveles proteicos de la subunidad Arp2. El complejo Arp2/3, es requerido en varias etapas de desarrollo del Sistema Nervioso y está compuesto por siete subunidades: las proteínas relacionadas con la actina Arp2 (44 kDa) y Arp3 (47 kDa) y cinco subunidades más (Arpc1-5) (Rouiller et al., 2008). Está reportado que los niveles proteicos de las 7 subunidades deben ser estrictamente regulados para que el complejo se ensamble y desensamble de acuerdo con las necesidades biológicas de las células (revisado en Chou y Wang, 2016). La desregulación de una o más subunidades resulta en alteraciones en la composición del complejo, afectando los procesos neuronales y contribuyendo posiblemente a la etiología de enfermedades psiquiátricas y neurológicas (Weitzdoerfer et al., 2002; Kim et al., 2013; Spence et al., 2016; Wang et al., 2016; Laboy Cintron et al., 2021).

No se han explorado en detalle los mecanismos subyacentes a la acumulación y degradación de cada subunidad, ni cómo se coordina la expresión de las 7 subunidades para diferentes funciones biológicas (revisado en Chou y Wang, 2016). Hasta el momento, en el Sistema Nervioso, se estudió y caracterizó la desregulación de las subunidades Arpc2, Arpc3 y Arpc4 y su impacto en la alteración de la estequiometría del complejo nucleador de actina Arp2/3 (Weitzdoerfer et al., 2002; Kim et al., 2013; Spence et al., 2016; Wang et al., 2016; Laboy Cintron et al., 2021). Nuestros resultados indican que el silenciamiento parcial de FGD6 resultó en una disminución de los niveles proteicos de la subunidad Arp2 del complejo Arp2/3. Este resultado es sumamente novedoso ya que hasta la fecha no se ha descrito la desregulación de esta subunidad. La disminución específica en los niveles de Arp2 podría no solo afectar la estequiometría del complejo sino también impactar en los procesos celulares que requieren de la remodelación del citoesqueleto de actina durante el desarrollo neuronal. Si bien está descrito que varias subunidades del complejo Arp2/3 incluida la subunidad Arp2 interactúan con FGD6 (Steenblock et al., 2014), no se ha reportado si dicha interacción es directa o indirecta. Sería interesante para futuros estudios investigar y poder

determinar cómo es que FGD6, un regulador putativo ubicado río arriba en la vía de señalización de Rac1, impacta en la estabilidad de Arp2 y el ensamblaje del complejo Arp2/3.

Resultados preliminares nuestros (no mostrados) sugerirían que el silenciamiento de FGD6 resultaría en una hiperfosforilación de la subunidad Arp2 del complejo Arp2/3. Está reportado que no sólo la estequiometría correcta es fundamental para la actividad del complejo Arp2/3, sino que además es condición necesaria la fosforilación de Arp2 para que se produzcan los cambios conformacionales que van a permitir la activación del mismo (LeClaire L. L. 3rd et al., 2008; Narayanan et al., 2011). Teniendo en cuenta que describimos una disminución significativa de los niveles proteicos de Arp2, más lo observado para la fosforilación de esta subunidad, es tentador hipotetizar que podría haber una suerte de compensación ante la disminución de esta subunidad mediante una hiper activación del complejo nucleador de actina para que pueda ejercer su función en la ramificación de actina. Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para confirmar la hiperfosforilación de Arp2.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la hiperactividad de Rac1 resultaba en alteraciones morfológicas de las neuronas (Zamboni et al, 2018; Banka et al., 2022). En el presente trabajo y en consonancia con lo descrito, observamos que la interferencia de FGD6 resultó en un aumento de la actividad de Rac1, en una disminución drástica en la marcación de actina F y produjo alteraciones morfológicas en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH. En particular, observamos que las células silenciadas, presentaban una morfología más alargada mientras que otras exhibieron un tamaño mayor al esperado.

Con el fin de caracterizar más en profundidad la causa de la disminución drástica de los filamentos de actina, evaluamos el contenido total de actina. Los resultados obtenidos evidenciaron que las células donde se silenció parcialmente a FGD6 no presentaron diferencias significativas de los niveles de actina total con respecto a los niveles observados en las células control. Este resultado nos sugirió que la interferencia de FGD6 afectaría la formación/ramificación de los filamentos de actina, sin modificar el contenido total de actina. Sin embargo, la inhibición parcial de FGD6 no afectó la cantidad de actina F (incorporada en el citoesqueleto) frente al contenido de actina G

(que se encuentra libre en el citosol), es decir, no afectó la dinámica de la actina. A pesar de esta observación, no descartamos que una disminución sostenida en el tiempo en los niveles de FGD6 terminen impactando en la dinámica de polimerización/despolimerización de los filamentos de actina y que no hayamos podido determinarlo dado que el ensayo de transfección con siRNAs tuvo un efecto transiente. Asimismo, y como se mencionó anteriormente, la eficiencia de transfección de los siRNAs no es del 100% y el tipo de análisis se realizó con un *pool* de células.

En éste trabajo se analizó la relación de FGD6 con Rac1, cuya asociación ha sido recientemente reportada (Matsuda et al., 2022). Sin embargo, existen evidencias de que FGD6 también interactúa con Rac2 (Steenblock et al., 2014). La familia de Rac esta compuesta por 3 miembros codificados por distintos genes: Rac1, Rac2 y Rac3. Rac3 presenta alta identidad de secuencia (88–92%) con las otras dos isoformas y es muy abundante en Sistema Nervioso (revisado en de Curtis, 2008). Por lo tanto, no podemos descartar que parte de los resultados obtenidos en este trabajo puedan deberse a una posible interacción de FGD6 con Rac3. Al respecto, Zamboni y colaboradores (2018) sugieren que la pérdida de función del regulador ArhGAP15 resulta en alteraciones similares a las descritas para modelos con pérdida de función de Rac1/3.

En resumen en este trabajo describimos que el silenciamiento de FGD6 produjo la hiperactividad de Rac1, una probable modificación de la estequiometría del complejo Arp2/3 y una disminución de la actina F detectada por falodina. Estos resultados nos sugieren que FGD6 es un modulador de la dinámica del citoesqueleto de actina. De lo mencionado hasta aquí se hace evidente la necesidad de evaluar el impacto de la desregulación de las Rho GTPasas en un contexto de análisis fino de sus moduladores, como sería FGD6, lo que permitiría obtener información mucho más certera de los mecanismos de acción de las mismas para así poder comprender con exactitud su participación en procesos fisiológicos y patológicos.

3. EXPRESIÓN DE FGD6 EN LA EPILEPSIA FOCAL AUTOLIMITADA DE LA INFANCIA

Mutaciones en FGD6 se asocian con degeneración macular, autismo y epilepsia (Huang et al., 2016; Thognak et al., 2018; Casalia et al., 2021). Con el fin de investigar las implicancias de puede tener la mutación p.E276G en homocigosis presente en FGD6 en

pacientes con Epilepsia Focal Autolimitada de la Infancia (SFEC) sobre el citoesqueleto de actina, trabajamos con fibroblastos provenientes de sujetos *wild type*, heterocigotas y homocigotas para FGD6 mutado y células pluripotentes inducidas (hiPS) generadas a partir de los grupos de fibroblastos mencionados anteriormente.

Nuestros resultados obtenidos en el Neuroepitelio generado a partir de hiPS mostraron que la mutación p.E276G en homocigosis en FGD6 se asocia con una acumulación anómala de la proteína perinuclear y en la membrana plasmática. Está ampliamente descrito que la proteostasis se mantiene mediante múltiples vías celulares, incluida la síntesis de proteínas, el control de calidad y la degradación. Un desequilibrio de la proteostasis, asociado con el mal plegamiento y la agregación de proteínas puede interferir con los procesos biológicos por la toxicidad celular que generan los agregados. Extensas evidencias han puesto de manifiesto que los agregados de proteínas podrían producir toxicidad más pronunciada en las neuronas que en otros tipos de células, en parte debido a que las neuronas son células altamente polarizadas y las actividades sinápticas asociadas a las mismas (revisado en Lim y Yue, 2015). Está reportado que múltiples enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington (EH), podrían tener mecanismos patológicos celulares y moleculares comunes, caracterizados por el mal plegamiento de proteínas que conduce a la agregación y acumulación de las mismas interfiriendo con los procesos neuronales (revisado en Argueti-Ostrovsky et al., 2021). Así la agregación y acumulación de la proteína tanto en la membrana plasmática como en la región perinuclear reportada en este trabajo podrían causar alteraciones en la función celular. Asimismo, esta mutación en homocigosis recesiva podría asociarse con pérdida/disminución de la actividad de FGD6 con la consecuente alteración de las vías de señalización en las que participa y podría contribuir al desarrollo de la SFEC.

Por otro lado, los fibroblastos de los pacientes con la mutación en homocigosis presentaron el citoesqueleto de actina alterado, similar a lo descrito con el silenciamiento; recapitulando los hallazgos *in vitro* y acompañando la hipótesis de que FGD6 mutado en SFEC ha perdido/disminuido su función. Nuestros resultados se ven acompañados por los descriptos por Huang y colaboradores (2016), quienes reportaron

un polimorfismo de FGD6 en la posición c.986A>G el cual produce un cambio de lisina por arginina en la proteína resultante en la posición 329 (p.K329R) asociado a degeneración macular. La mutación p.K329R en FGD6 resulta en alteraciones en la localización celular de la proteína y en el citoesqueleto de actina en células endoteliales microvasculares de la retina humana (Huang et al., 2016); sin embargo, los autores no van más allá en los posibles mecanismos involucrados. El polimorfismo mencionado previamente se encuentra en el exón 2 de FGD6 muy próximo al descrito en esta Tesis. El hecho de que ambas mutaciones se encuentran en la región laxa de la proteína sugeriría que esta región es importante para la correcta función de FGD6.

Finalmente, sería interesante estudiar en profundidad la posible participación de FGD6 en la epileptogénesis, dado que nuestros resultados muestran cierta similitud a lo reportado por otros grupos de investigación que estudiaron como las convulsiones producían una disminución de la polimerización de la actina F (Ouyang et al., 2007; Xiong et al., 2015; Yang et al., 2019; Yang et al., 2020). Una información más detallada sobre los mecanismos reguladores involucrados puede conducir en última instancia a nuevas estrategias terapéuticas para tratar las convulsiones o prevenir los déficits neurocognitivos en la epilepsia.

Los resultados de esta sección en su conjunto nos ayudan a empezar a dilucidar la fisiopatología de las SFEC: sabemos que FGD6 está asociado a la enfermedad y que cumple una función como modulador del citoesqueleto de actina neuronal; que la mutación p.E276G en homocigosis resulta en la agregación de la proteína causando posiblemente una disminución/ pérdida de su actividad; que FGD6 mutado en pacientes con SFEC afecta el citoesqueleto de actina y perturba la actividad neuronal, como se reportó previamente (Casalía et al., 2021), y que esta la función neuronal alterada se asocia con un síndrome epiléptico. De todo lo mencionado anteriormente destacamos la relevancia que tiene poder dilucidar cuáles son las vías de señalización afectadas en las SFEC y la importancia de poder caracterizar las proteínas implicadas en esas vías, así como los efectos de las mutaciones en dichas proteínas. Particularmente, esclarecer cómo es la regulación que ejerce FGD6 en la vía de señalización del citoesqueleto de actina podría aportar un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de diferentes desórdenes neurológicos.

Conclusión

1- CONCLUSIÓN FINAL

La expresión de FGD6 se encuentra finamente regulada durante la diferenciación neuronal y presenta características estructurales que lo proponen como un modulador central en vías de señalización neuronales. La inhibición de FGD6 afecta vías intracelulares que impactan en el citoesqueleto de actina, pudiendo así alterar la morfología y la función celular. Los resultados presentados en esta Tesis permiten comenzar a esclarecer el mecanismo por el cual FGD6 modula vías de señalización de Rac1, pudiendo ser de manera directa y/o indirecta, a través de factor(es) que interacciona(n) con los distintos componentes de las mismas (Figura D1). Finalmente, los hallazgos obtenidos ayudan a comenzar a comprender la posible contribución de FGD6 no sólo sobre la fisiopatología de enfermedades neurológicas como la SFEC, sino también sobre los mecanismos básicos del desarrollo y la función neuronal.

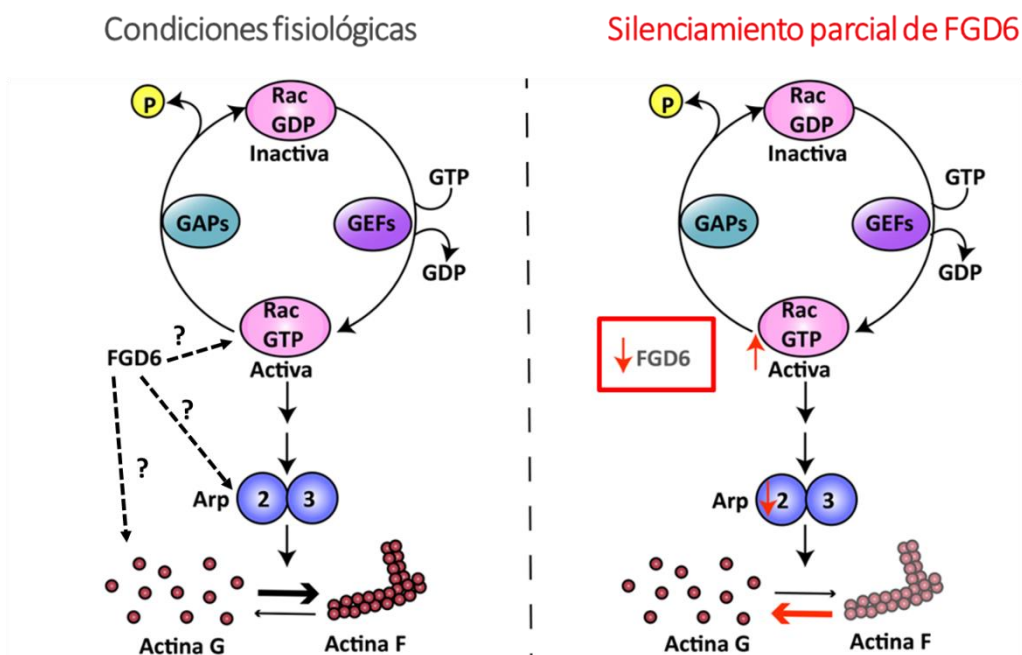


Figura D1. El silenciamiento de FGD6 causa efectos en el citoesqueleto de actina: produce la hiperactividad de Rac1, la disminución en los niveles de Arp-2 y una disminución drástica en la marcación de actina filamentosa (indicando la despolarización de los filamentos), sin cambios en el contenido de actina total. Estos resultados nos sugieren que FGD6 es un modulador de la dinámica del citoesqueleto de actina y que su silenciamiento de causa efectos que podrían impactar en la diferenciación y actividad neuronal.

2- CONCLUSIONES GENERALES

2.1 La región N-terminal de FGD6 presenta una región intrínsecamente desordenada o IDR, con mayor probabilidad de interactuar con otros dominios/proteínas ordenadas entre las posiciones aminoacídicas 760 y 880; y presenta numerosos sitios posibles de fosforilación en la región adyacente a la zona predicha como IDR que podrían estar implicadas en cambios conformacionales de la proteína, regulando posiblemente una autoinhibición y/o interacción con otras proteínas. Dadas estas características estructurales, FGD6 podría actuar como *scaffold* en las vías de señalización de Rac1.

2.2 La disminución en la expresión de FGD6 produjo:

- ✓ Hiperactividad de Rac1: está reportado que la hiperactividad de esta Rho GTPasa produce una alteración en la dinámica del citoesqueleto de actina y esto está asociado a deficiencias cognitivas y a trastornos del desarrollo neuronal (Zamboni V et al., 2018; Banka et al., 2022).
- ✓ Una disminución significativa de los niveles de Arp2: esto podría afectar no sólo la estequiometría del complejo, sino también impactar en el largo axonal, el desarrollo de espinas dendríticas y la actividad neuronal, entre otros.
- ✓ Alteraciones en la expresión de actina F y la morfología celular: esto podría impactar en la regulación de la correcta función neuronal y contribuir así al desarrollo de enfermedades.

2.3 La mutación p.E276G en homocigosis recesiva en FGD6 resulta en la agregación de la proteína causando posiblemente una disminución/ pérdida de su actividad. Asimismo, FGD6 mutado afecta el citoesqueleto de actina. Los efectos en el citoesqueleto podrían impactar en la diferenciación y actividad neuronal previamente descritas (Casalía et al., 2021), posiblemente contribuyendo a la fisiopatología de la SFEC.

En conjunto, los resultados originales de esta Tesis permitieron determinar que FGD6 está asociado al correcto funcionamiento del citoesqueleto de actina y que alteraciones en su expresión/ función afectan el citoesqueleto pudiendo impactar en la diferenciación y actividad neuronal.

Materiales y Métodos

1- Cultivo celular

1.1 Mantenimiento de las células SK-N-SH

Las células de la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH (ATCC® HTB-11) se mantuvieron en medio “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*” (DMEM)(GIBCO) adicionado con SFB (Internegocios) al 10% y suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, penicilina 50 IU/ml y estreptomina 50 mg/ml. El medio fue renovado cada 48h. Las células fueron crecidas en estufa a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ y utilizadas en los ensayos descritos posteriormente en este capítulo. A lo largo de todo el trabajo se utilizaron células entre los pasajes 18 a 28.

1.2 Mantenimiento de células de fibroblastos humanos y células pluripotentes inducidas (hiPS)

Los fibroblastos provenientes de sujetos *wild type*, heterocigotas y homocigotas para la mutación p.E276G en FGD6, y las células pluripotentes inducidas (hiPS) obtenidas a partir de la reprogramación celular de dichos grupos de fibroblastos, fueron cedidas gentilmente por el Dr. Pitossi, jefe del Laboratorio de Terapias Regenerativas y Protectoras del Sistema Nervioso Central, Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET.

1.2.1 Fibroblastos humanos

Los fibroblastos provenientes de sujetos *wild type*, heterocigotas y homocigotas para la mutación p.E276G en FGD6 fueron sembrados en placas de 24 pocillos sobre vidrios de 12 mm de diámetro previamente tratados con poliornitina/laminina. Los fibroblastos se mantuvieron en medio DMEM alta glucosa (GIBCO) adicionado con SFB (GIBCO) al 20% y suplementado con L-glutamina (SIGMA) 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, anfotericina B (Invitrogen) 0.3 µg/ml, penicilina 100 IU/ml y estreptomina 100 µg/ml. El medio fue renovado cada 48h. Las células fueron crecidas en estufa a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ y utilizadas en los ensayos descritos posteriormente en este capítulo.

1.2.2 Producción de fibroblastos murinos embrionarios (MEFs)

Todos los procedimientos se llevaron a cabo según el protocolo aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Fundación Instituto Leloir.

Para la producción de fibroblastos murinos embrionarios (MEF) se utilizaron ratones hembra CF1 de 12.5 días de gestación según Nagy y colaboradores (2006). Brevemente, se sacrificaron las hembras por dislocación cervical y se removió el útero. Este se colocó en un tubo de 50 ml con PBS suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0.3 µg/ml en hielo. Bajo flujo laminar, se colocaron los embriones en una placa de Petri de vidrio, se separaron de la placenta y del saco vitelino. Se procedió con la disección de manera de separar la cabeza y las vísceras coloreadas de rojo para ser descartadas. Se realizó un lavado con PBS y se colocó en una nueva placa de Petri de vidrio para triturar mecánicamente con bisturí. Se colocó el material en un tubo Falcon de 50 ml y se realizó una digestión enzimática con tripsina (Invitrogen) (dilución 1:3 de solución de 0.05% tripsina + 0.02% EDTA) durante 45 min a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂. Luego del tiempo establecido se agregó medio MEF compuesto por medio DMEM alta glucosa (Invitrogen) suplementado con SFB (Internegocios) al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y glutamina 2 mM hasta completar el volumen del tubo Falcon y se dejó decantar la preparación por 20 min. Luego se tomó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo. Este se centrifugó a temperatura ambiente por 5 min a 1000 rpm. Se aspiró el medio y se resuspendió en pellet de células en medio MEF. Se plaqueó en una cantidad equivalente a 1-2 embriones por cada p150 (Greiner Bio-One) para realizar la expansión del cultivo. En pasaje 4 las muestras fueron irradiadas a 6000 rads, y congeladas para su posterior utilización como "capa alimentadora" o "*feeder layer*" a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/criotubo.

1.2.3 Células Pluripotentes Inducidas (hiPS)

Las células pluripotentes inducidas (hiPS) provenientes de fibroblastos *wild type*, heterocigotas y homocigotas para la mutación p.E276G en FGD6 fueron sembradas en placas de seis pocillos previamente tratadas con gelatina 0.1% (SIGMA) y una *feeder layer* de MEFs con una densidad de 16.000 células/cm². Las hiPS se mantuvieron en

medio CMR (célula madre reprogramada) completo compuesto por medio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado con *Knockout Serum Replacement* (KSR) (Invitrogen) al 20%, aminoácidos no esenciales (Invitrogen) 0.1 mM, 2-β-mercaptoetanol (Invitrogen) 0.1 mM, L-glutamina (SIGMA) 2 mM, anfotericina B (Invitrogen) 0.3 µg/ml, penicilina (Invitrogen) 100 U/ml y estreptomicina (Invitrogen) 100 µg/ml con el agregado en el momento de FGF2 (Peprotech) 20 ng/ml, renovándolo cada 48h. Las células fueron crecidas en estufa a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ y utilizadas como se describe más adelante.

1.3 Protocolos de diferenciación celular

1.3.1 Diferenciación de células SK-N-SH

Las células SK-N-SH fueron diferenciadas siguiendo el protocolo de Preis y colaboradores (1998) con modificaciones. Brevemente, las células fueron sembradas en placas de seis pocillos a una densidad celular de 30.000 células por pocillo, y a las 24h fueron tratadas con *all-trans* ácido retinoico (AR) (Sigma) 10 µM durante 9 días. Se renovó el medio y el AR cada 48 h. Los controles fueron tratados con DMSO, vehículo en el cual se disolvió el ácido retinoico. A 3, 6 y 9 días del tratamiento, las células fueron cosechadas, se extrajo el ARN y se determinó su concentración con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Todo el material aislado se almacenó en solución a -80°C hasta su uso.

1.3.2 Protocolo de Diferenciación de hiPS a Neuroepitelio (NE)

Las células pluripotentes inducidas (hiPS) fueron sometidas a un protocolo de diferenciación a NE desarrollado en el laboratorio del Dr. Pitossi (Casalia et al., 2021). Brevemente, las colonias de hiPS se disgregaron en forma mecánica y fueron transferidas a una placa no adherente de 6 pocillos para ser crecidas en suspensión e iniciar el proceso de diferenciación y formación de agregados. Estas colonias de hiPS en suspensión fueron mantenidas 48 h en medio CMR completo para luego ser transferidas a un medio de inducción neural (1er suspensión) realizando cambios cada 48 h por decantación durante 7 días. Los primeros 5 días el medio utilizado fue NIM1 compuesto por medio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado con KSR (Invitrogen) al 20%,

aminoácidos no esenciales (Invitrogen) 0.1 mM, 2-β-mercaptoetanol (Invitrogen) 0.1 mM, L-glutamina (SIGMA) 2 mM, anfotericina B (Invitrogen) 0.3 µg/ml, penicilina (Invitrogen) 100 U/ml y estreptomycin (Invitrogen) 100 µg/ml. Y los últimos 2 días se incubaron en medio NIM2 compuesto por DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (Invitrogen) 0.1 mM, anfotericina B (Invitrogen) 0.3 µg/ml, N2 1X, heparina 2 µg/ml, penicilina (Invitrogen) 100 U/ml y estreptomycin (Invitrogen) 100 µg/ml. El día 8 los agregados fueron transferidos a placas pretratadas con gelatina 0.1% y SFB (GIBCO) para su adhesión (1ra adhesión) y se mantuvieron en medio definido para NE (medio NIM2) realizando cambios cada 48 h durante 10 días. Transcurrido ese tiempo (día 17) el NE primitivo obtenido fue disgregado y las rosetas neurales transferidas para ser crecidas nuevamente en suspensión (2da suspensión) durante 8 días en medio NIM3 compuesto por medio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado con KSR (Invitrogen) al 20%, aminoácidos no esenciales (Invitrogen) 0.1 mM, 2-β-mercaptoetanol (Invitrogen) 0.1 mM, L-glutamina (SIGMA) 2 mM, anfotericina B (Invitrogen) 0.3 µg/ml, penicilina (Invitrogen) 100 U/ml, estreptomycin (Invitrogen) 100 µg/ml, cAMP 1 µM, B27 1X e IGF-1 2.5 ng/ml. El día 25 de iniciado el protocolo los cultivos fueron adheridos (2da adhesión) sobre una superficie pretratada con poliornitina/laminina para iniciar la diferenciación final durante 6 semanas adicionales (10 semanas tiempo total de diferenciación) en medio de diferenciación neural NDM compuesto por medio Neurobasal: DMEM/F12 (50:50) suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, anfotericina B 0.3 µg/ml, N2 1X, heparina 2 µg/ml, BDNF 10 ng/ml, GDNF 10 ng/ml, B27 1X, ácido ascórbico 10 ng/ml, cAMP 1 µM, IGF-1 10 ng/ml, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml, renovado cada 48 h. Al alcanzar las 8 semanas de diferenciación los cambios de medio se realizaron cada 96 h. Una vez alcanzado el tiempo de diferenciación de 10 semanas, el NE obtenido fue fijado con paraformaldehído (PFA) 4% durante 10 min a temperatura ambiente para evaluar la expresión de la proteína FGD6 por inmunocitoquímica.

2- Silenciamiento de FGD6 mediante ARN pequeños de interferencia (siRNA)

2.1 Muestras para Western Blot o RT-qPCR

Se sembraron 300.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. A las 24 h, se removió el medio de las células, se agregaron 800 μ l de medio completo nuevo por pocillo y se transfectaron las células. Para la transfección se utilizó el sistema Lipofectamine2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para cada reacción se prepararon 2 tubos con 100 μ l de OPTI-MEM (ThermoFisher Scientific) cada uno. En un primer tubo se adicionaron 6 μ l de Lipofectamine2000 y se agitó vigorosamente. En un segundo tubo se agregaron 2 μ l de una mezcla 20 μ M de 4 ARN de interferencia (siRNA) específicos para FGD6 (Dharmacon) (Tabla M1) para obtener una concentración final de 20 nM de siRNA por pocillo. Se mezcló el contenido de ambos tubos, se agitó vigorosamente y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregó la mezcla en el pocillo correspondiente con un volumen final de 2 ml. Como control se utilizó el conjunto de siRNA desordenados (*Scramble*) "ON-TARGETplus Non-targeting control pool" (Dharmacon) (Tabla M1). Una vez agregada la mezcla de transfección, se cultivaron las células durante 72 h y posteriormente fueron procesadas para su análisis de acuerdo con el ensayo realizado.

2.2 Muestras para Inmunofluorescencia

En placas de 24 pocillos se colocaron vidrios de 12 mm de diámetro tratados previamente con una solución de poli-L-lisina (10 μ g/ml) para facilitar la adhesión de las células. Al día siguiente, se lavaron con agua estéril a fin de remover cualquier exceso del reactivo. Un día antes de la transfección, se sembraron 40.000 células SK-N-SH sobre los vidrios. Para llevar a cabo el silenciamiento de FGD6 se utilizó el sistema Lipofectamine2000 descrito en 2.1, respetando la relación 1:3 siRNA: Lipofectamine2000. Brevemente, para cada reacción se prepararon 2 tubos con 50 μ l de OPTI-MEM (ThermoFisher Scientific) cada uno. En un primer tubo se adicionaron 3 μ l de Lipofectamine2000 y se agitó vigorosamente. En un segundo tubo se agregó 1 μ l de una mezcla 20 μ M de 4 ARN de interferencia (siRNA) específicos para FGD6 (Dharmacon) (Tabla M1) para obtener una concentración final de 20 nM de siRNA por pocillo. Se mezcló el contenido de ambos tubos, se agitó vigorosamente y se incubó durante 10

min a temperatura ambiente. Finalmente se agregó la mezcla, en el pocillo correspondiente con un volumen final de 1 ml. Como control se utilizó el conjunto de siRNA desordenados (*Scramble*) (Dharmacon) (Tabla M1). Una vez agregada la mezcla de transfección, se cultivaron las células durante 48 h y luego fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% durante 10 min a temperatura ambiente para su análisis.

Tabla M1. Secuencias de los siRNAs provistos por Dharmacon con el objetivo de reducir los niveles de ARNm de FGD6 en células SK-N-SH. La empresa garantiza que las secuencias silenciarán la expresión del gen objetivo en al menos un 75 % a nivel de ARNm.

Especie	Nombre del siRNA	Secuencia 5' a 3'
Humano, rata y ratón	Non-targeting control pool 1	UGGUUUACAUGUCGACUAA
Humano, rata y ratón	Non-targeting control pool 2	UGGUUUACAUGUUGUGUGA
Humano, rata y ratón	Non-targeting control pool 3	UGGUUUACAUGUUUUCUGA
Humano, rata y ratón	Non-targeting control pool 4	UGGUUUACAUGUUUCCUA
Humano	siRNA FGD6 1	GAAGGGACCGUUUUUAUAA
Humano	siRNA FGD6 2	GAAUCCGAGUCUAAAGUA
Humano	siRNA FGD6 3	CUAAGCAGCUAAAUAAC
Humano	siRNA FGD6 4	GCUCGUCUGUUACGCCAAA

3-Cultivo primario de neuronas corticales

Este estudio fue llevado adelante en estricta conformidad con las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio del National Research Council (US). Los protocolos fueron revisados y aprobados por el CICUAL de la Fundación Instituto Leloir.

Los cultivos primarios fueron realizados como describe Castelletto y col. (2017) con modificaciones. Brevemente, se utilizaron embriones de 16-17 días de gestación a los cuales se sacrificó por decapitación previa anestesia y se removió el cerebro. Posteriormente se separaron las cortezas libres de meninges que se resuspendieron en la solución comercial "*Hank's Balanced Salt Solution*" (HBSS) (Gibco). El tejido se incubó

con 4 ml de tripsina-EDTA 25% (Gibco) durante 20 min a 37°C. Una vez finalizada la incubación, el tejido fue centrifugado a 1.000 rpm durante 2 min, resuspendido en DMEM (GIBCO) adicionado con SFB (Internegocios) al 10% e incubado durante 10 min a 37°C. A continuación, el tejido fue lavado con DMEM (GIBCO) suplementado con SFB (Internegocios) al 10% e incubado 10 min a temperatura ambiente. Inmediatamente se procedió a la disgregación del tejido en 1 ml de medio Neurobasal (GIBCO) hasta que la solución se tornó homogénea. Se dejó decantar la solución durante 10 min, se centrifugó a 1.000 rpm durante 1 min y se resuspendió en medio Neurobasal (GIBCO) suplementado con B27, L-glutamina 0.5 mM, penicilina 50 IU/ml y estreptomycin 50 mg/ml (GIBCO). Las células se sembraron en material previamente recubierto con poli-L-lisina (Sigma) 1 mg/ml acorde a los requerimientos de cada experimento planteado e incubadas en estufa a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂. Tres días luego de realizado el cultivo (DIV3, días *in vitro*), se trató a las células durante tres días con arabinósido de citosina (AraC) (Sigma) a una concentración final de 1 μM para inhibir la proliferación glial sin afectar la supervivencia neuronal. Luego de este periodo, se agregó medio fresco a las neuronas. Con este protocolo se logró obtener un cultivo celular con un 90-95% de neuronas. A 3, 7, 10 y 14 días de la diferenciación neuronal, las células fueron congeladas a -80°C o fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% por 10 min a temperatura ambiente para su posterior análisis.

4-Inmunofluorescencia

Las células descritas en las secciones anteriores que fueron fijadas con PFA 4% en buffer fosfato (PB) 0.1 M por 10 min a temperatura ambiente, fueron utilizadas en esta sección para los ensayos de inmunocitoquímica. Las células fijadas se lavaron con PBS a fin de remover cualquier exceso de solución fijadora. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con PBS-Tritón X-100 0.1% durante 20 min y a continuación incubadas con una solución de bloqueo de PBS-Tritón X-100 0.1% con suero de burro (Sigma-Aldrich) al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la incubación con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla M2) diluidos en solución de bloqueo durante 16 h a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 2 lavados con buffer PB 0.1 M, se agregó una dilución 1/2000 del reactivo de Hoescht 33258 (SIGMA) durante 5 min para la detección de núcleos, del cual se removió el excedente mediante

3 lavados con buffer PB 0.1 M. Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a un fluoróforo (Tabla M3) diluido en buffer PB 0.1 M por 2 h a temperatura ambiente. Para evaluar los filamentos de actina, las células fueron incubadas con faloidina (sonda de alta afinidad para actina F) conjugada a rodamina (Thermofisher) durante 16 h a 4°C. Finalmente se realizó un lavado con buffer PB 0.1 M y las células se montaron sobre cubreobjetos utilizando gelvatol (Calbiochem) como agente preservante. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal Zeiss-LSM 510 META y analizadas con el software ImageJ.

Tabla M2. Anticuerpos primarios empleados en Inmunofluorescencia.

Anticuerpo Primario	Especie de origen	Marca y código	Dilución de uso
anti-FGD6	Conejo	Aviva OAAB07348	1/400
anti-Tubulina BIII	Ratón	Abcam ab78078	1/1000
anti-GFAP	Conejo	DAKO N1506	1/700

Tabla M3. Anticuerpos secundarios empleados en Inmunofluorescencia.

Anticuerpo Secundario	Especie de origen	Marca y código	Dilución de uso
anti-conejo-Alexa488	Burro	Jackson 711-451-152	1/1500
anti-ratón-Cy3	Burro	Jackson 715-165-150	1/1000
anti-conejo-Cy5	Burro	Jackson 711-175-152	1/2000

5-Transmisión de Energía de Resonancia (FRET)

5.1 Vectores Raichu-Rac1 y Raichu-Cdc42

Para los ensayos de esta sección, se utilizaron los plásmidos Raichu-Cdc42 y Raichu-Rac1 que reportan el equilibrio local entre las actividades de los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) y las proteínas activadoras de GTPasa para Rac1 y Cdc42. Estos vectores expresan un biosensor que, dependiendo del grado de activación de Rac1/ Cdc42, cambia los niveles de FRET entre las proteínas fluorescentes codificadas

en el mismo vector (Itoh et al., 2002). El vector Raichu-Rac consiste, desde el extremo amino terminal, en YFP (aminoácidos [aa] 1 a 239), un espaciador (Leu-Asp), la secuencia CRIB de PAK1 (aa 68 a 150), un espaciador (Ser-Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Gly-Thr), Rac1 (aa 1 a 176), un espaciador (Gly-Gly-Arg), CFP (aa 1 a 237), un espaciador (Gly-Arg-Ser-Arg), y la secuencia CAAX box de Ki-Ras (aa 169 a 188). En el vector Raichu-Cdc42, Rac1 fue reemplazado por Cdc42 (aa 2 a 176).

5.2 FRET

Se sembraron 20.000 células de la línea SK-N-SH sobre vidrios de 12 mm en una placa de 24 pocillos. Las células fueron transfectadas con el sistema Lipofectamine2000 descrito en 2. Se utilizaron 800 ng de cada biosensor y 0.5 uL de siRNA FGD6 20 µM por condición, en un volumen total de 250 µl por well. La reacción se realizó en medio OPTIMEM (ThermoFisher Scientific), en ausencia de suero y antibióticos. Luego de 2 h, el medio de transfección se reemplazó completamente por DMEM suplementado con SFB al 10%. Las células se cultivaron 48 h en este medio y se fijaron con 4% PFA/sacarosa en PBS 1X durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, los preparados se conservaron con gelvatol. Para estimar la eficiencia de FRET, se excitó el donador (CFP) con láser 433 nm y la emisión se recolectó a 475 nm. El canal de FRET se excitó con láser 433 nm y la emisión se recolectó a 527 nm. La eficiencia de FRET se estimó dividiendo el canal FRET por el donador. La imagen resultante se multiplicó por la máscara binaria del donador para desestimar señales fuera del rango 0-1.

6-Obtención de Actina filamentosa (F) y Actina monomérica (G)

A partir de células SK-N-SH transfectadas con siRNA FGD6 como se mencionó anteriormente en la sección 2.1, se obtuvieron fracciones celulares de actina F y de actina G y se determinó la relación entre las mismas siguiendo el protocolo de Pyronneau y colaboradores (2017), con modificaciones. Brevemente, 48 h post transfección, las células fueron lavadas con PBS y luego, lisadas con 0.5 ml de buffer de lisis frío [K_2HPO_4 10 mM, NaF 100 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 1 mM, DTT 0.2 mM, Triton X-100 0,5%, sacarosa 1 mM, (pH 7,0)] durante 45 min en hielo. A continuación, se realizó una centrifugación a 13.000 g durante 45 min a 4°C y el sobrenadante conteniendo actina G se transfirió a un tubo nuevo. El pellet con actina F

se resuspendió en 0.5 ml de una mezcla de partes iguales de buffer de lisis con un segundo buffer [clorhidrato de guanidinio 1.5 mM, acetato de sodio 1 mM, CaCl_2 1 mM, ATP 1 mM, tris-HCl 20 mM, (pH 7,5)] y luego se incubó en hielo durante 1 h con agitación suave cada 15 min. Este paso permitió la conversión de la actina F en actina G. Las muestras se centrifugaron a 13.000 g durante 45 min a 4°C y el sobrenadante (actina G proveniente de la actina F) se transfirió a un tubo nuevo. Se evaluó el contenido de actina F y actina G mediante el ensayo de Western Blot.

7-Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western Blot

7.1 Extracción de proteínas

Las células descritas previamente en la sección 2.1 fueron homogenizadas en solución “*Radioimmuno-precipitation assay*” (RIPA) (Tris-HCl 50 mM pH 8; NaCl 150 mM; deoxicolato de sodio al 0,5%; Triton X-100 al 1%) suplementada con SDS al 1% e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM; EDTA 5 mM; EGTA 5 mM; leupeptina 5 µg/ml; aprotinina 10 µg/ml; pepstatina 1 µg/ml) y de fosfatasas (fluoruro de sodio 50 mM y ortovanadato de sodio 5 mM). Las muestras fueron sonicadas durante 1 min 30 seg a 4°C. Luego, se centrifugaron a 14.000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se guardó a -80°C hasta su utilización. La concentración de proteínas se determinó con el kit comercial Ensayo de proteínas Pierce™ BCA™ (Thermofisher) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.2 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida tris-tricina (SDS- PAGE) y Western Blot

Los extractos proteicos anteriormente preparados en las secciones 6 y 7.1 se diluyeron en buffer Laemmli (SDS al 2%, Tris-HCl 62.5 mM, glicerol al 10%, pH 6.8) con DTT (concentración final de 1 mM) y se desnaturizaron a 100°C durante 10 min.

Se sembraron 20-50 µg de proteínas/calle en geles de poliacrilamida Tris-Tricina al 7.5% o 12.5%. Los geles se prepararon con buffer Tris-HCl 3 M, SDS al 0.3% pH 8,43 y glicerol al 10.6% (v/v). La polimerización del gel fue realizada en presencia de persulfato de amonio 0.1% (p/v) y TEMED 0.05% (p/v).

La corrida electroforética se realizó a 90 V con buffer ánodo (Tris-HCl 0.2 M, pH 8.9) y buffer cátodo (Tris-HCl 25 mM, glicina 195 mM y SDS al 0.1%, pH 8.3). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de polifloruro de vinilideno (PVDF) (GE Healthcare Life Sciences) a 400 mA en solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 0.19 M, metanol al 20% (v/v) pH 8,3) durante 2 h. Las membranas conteniendo las proteínas se utilizaron para ensayos de Western Blot.

7.2.1 Detección de proteínas por método quimioluminiscente

El bloqueo de las membranas se llevó a cabo con leche descremada al 5% en TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM), Tween-20 0.1% (TBS-T 0.1%) durante 1 h y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios específicos (Tabla M4) diluidos en leche descremada al 0.5% en TBS-T 0.1% durante 16 h a 4°C. Al día siguiente se lavaron las membranas 3 veces por 10 min con TBS-T 0.1%. Finalmente, se incubaron durante 2 h con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson) (Tabla M5).

La detección de las proteínas se llevó a cabo utilizando el reactivo ECL Prime™ y el equipo LAS4000™ de la compañía GE LifeScience. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el software ImageJ.

7.2.2 Detección de proteínas por método de fluorescencia

Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM) durante 1 h y luego se incubaron con los anticuerpos primarios específicos (Tabla M4) diluidos en leche descremada al 0.5% en TBS-Tween-20 0.1% (TBS-T 0.1%) durante 16 h a 4°C. Al día siguiente se lavaron las membranas 4 veces por 7 min con TBS-T 0.1% y se incubaron en oscuridad durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a un fluoroforo (LI-COR Biotechnology) (Tabla M5). A continuación, se lavaron las membranas 4 veces por 7 min con TBS-T 0.1%. Finalmente, se realizó un lavado final con TBS durante 5 min.

La detección de las proteínas de interés se realizó con el equipo Odyssey CLx Imager (LI-COR Biotechnology). El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el software ImageJ.

Los anticuerpos utilizados en los ensayos descritos en 7.2.1 y 7.2.2 se enumeran en las tablas M4 y M5.

Tabla M4. Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de Western Blot.

Anticuerpo Primario	Especie de origen	Marca y código	Dilución de uso
monoclonal anti-Arp2	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-166103	1/500
monoclonal anti-Arp3	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-48344	1/1000
anti-Actina	Conejo	Sigma, A2066	1/1000
anti-LDH	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, sc-33721	1/1000
anti- p-LIMK1 (Thr508)	Conejo	Cell Signaling #3841	1/1000
monoclonal anti- LIMK1 (H-12)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-515585	1/750
monoclonal anti- p-Cofilin 1 (E-5)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, Sc-271921	1/5000
monoclonal anti- Cofilin 1 (E-8)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, Sc-376476	1/5000
anti- Beta Actin	Conejo	Abcam, ab8227	1/5000

Tabla M5. Anticuerpos secundarios empleados en los ensayos de Western Blot.

Anticuerpo Secundario	Especie de origen	Marca y código	Dilución de uso
anti-IgG ratón-HRP	Cabra	Jackson, 115-036-008	1/5000
anti-IgG conejo-HRP	Cabra	Jackson, 111-035-144	1/5000 - 1/15000
anti-IgG ratón-IRDye800	Cabra	LI-COR Biotechnology	1/5000 - 1/20000
anti-IgG conejo-IRDye800	Cabra	LI-COR Biotechnology	1/5000 – 1/20000
anti-IgG conejo-IRDye680	Cabra	LI-COR Biotechnology	1/5000

8-Extracción de ARN total y producción de ADN complementario

8.1 Extracción de ARN total

Para la obtención de ARN, las células SK-N-SH fueron sembradas en placas de 6 pocillos a razón de 3×10^5 células por pocillo y las neuronas corticales de rata fueron sembradas en placas p60 a razón de 4×10^6 células por placa. Se realizó la extracción de ARN total empleando el kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar los contaminantes de DNA las muestras fueron tratadas con ADNasa (OnColumn DNase I Digestion, Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración del ARN total de cada muestra midiendo la absorbancia a 260 nm empleando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Todo el material obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso.

8.2 Producción de ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción (RT-PCR)

La retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 500ng de ARN mediante el sistema SuperScript II (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando Oligo-dT como cebadores. Brevemente, el ARN se incubó con 1 μL Oligo-dT 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y dNTPs 10 mM cada uno a 65°C durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo durante 1 min. Sobre ésta misma mezcla se adicionaron 2 μL de DTT 0.1 M y “*First strand buffer*” en cantidad necesaria para 20 μL finales. Se incubó la mezcla a 42°C 2 min, se adicionaron 0,5 μL de retrotranscriptasa y finalmente, se incubó 2 h a 42°C .

9-Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Los ADNc obtenidos se emplearon para realizar las reacciones de q-PCR con el método fluorescente de SYBR-green. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado técnico a fin de constatar la fiabilidad de la medición efectuada. El equipo utilizado fue el Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) y los datos fueron analizados con el software Stratagene MxPro TM QPCR de la misma empresa. El gen TATA box binding

proteín (TBP) de expresión constitutiva se empleó para normalizar. Se calculó la eficiencia de las reacciones con el software LinReg PCR (Cikos et al., 2007).

El programa de PCR utilizado, salvo que se indique lo contrario, fue:

10min a 95°C
 30seg a 95°C
 30seg a 58°C
 30seg a 72°C
 } 40 veces
 10min a 72°C

La especificidad fue controlada por curvas de disociación y geles de agarosa. Para determinar el correcto tamaño del producto de PCR generado, se sembraron 10 µl de cada tubo con 2 µl de buffer de siembra (30% glicerol en PBS con Orange G) en un gel de agarosa 1% con 0.5 mg/ml de BrEt, se corrieron a 70 V durante 1 h y se revelaron bajo luz UV. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla M6.

Tabla M6. Cebadores específicos utilizados para las PCR en tiempo real.

Especie	Nombre del cebador	Secuencia 5' a 3'	Tamaño producto PCR
<i>Rattus norvegicus, Homo sapiens</i>	TBP directo	ACCGTGAATCTTGGCTGTAA	114pb
	TBP reverso	CCGTGGCTCTCTTATTCTCA	
<i>Rattus norvegicus</i>	FGD6 rata directo	CCCAAGCCTAAGTTAGTGGG	125pb
	FGD6 rata reverso	GGTTTTGGAGCAATTGCCGG	
<i>Homo sapiens</i>	FGD6 humano directo	TCTGGCCCTCAAGCACTACCT	161pb
	FGD6 humano reverso	CATTGGCGTGGTTGGCTACCT	
<i>Rattus norvegicus, Homo sapiens</i>	ARP2 directo	GGAAGGTGGTGGTGTGCGAC	126pb
	ARP2 reverso	CCACTTTGGTGGTTGATCTG	

10-Análisis estadísticos

Todos los resultados están presentados en esta Tesis como las medias \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 3 réplicas biológicas independientes. Los datos fueron analizados mediante las siguientes pruebas estadísticas: ANOVA de medidas repetidas de una vía seguido de la prueba post-hoc Tukey para comparaciones múltiples, Prueba t de Student de dos colas, Prueba no paramétrica de Wilcoxon o de Mann Whitney, como se indica en los análisis correspondientes. El nivel de significancia fue establecido en $p \leq 0.05$. El programa utilizado para los análisis fue Prism® Graphpad 6.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Aarskog D., 1971. A familial syndrome of short stature associated with facial dysplasia and genital anomalies. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 7 (6): 235-239.

Abemayor E., Sidell N., 1989. Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environ. Health. Perspect.* 80: 3-15.

Aghazadeh B., Lowry W. E., Huang X. Y., Rosen M.K., 2000. Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell.* 102 (5): 625-633.

Alekhina O., Burstein E., Billadeau D. D., 2017. Cellular functions of WASP family proteins at a glance. *J. Cell Sci.* 130: 2235-2241.

Ando T., Kato R., Honda H., 2015. Differential variability and correlation of gene expression identifies key genes involved in neuronal differentiation. *BMC Syst Biol.* 9: 82.

Andrianantoandro E., Pollard T.D., 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell.* 24: 13-23.

Arber S., Barbayannis F. A., Hanser H., Schneider C., Stanyon C. A., Bernard O., Caroni P., 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature.* 393 (6687): 805-809.

Argueti-Ostrovsky S., Alfahel L., Kahn J., Israelson A., 2021. All Roads Lead to Rome: Different Molecular Players Converge to Common Toxic Pathways in Neurodegeneration. *Cells.* 10 (9): 2438.

Avila J., Sousa M. M., Sayas C. L., 2020. Editorial: Shaping the Brain by Neuronal Cytoskeleton: From Development to Disease and Degeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 14:12.

Bamburg J. R., Minamide L. S., Wiggan O., Tahtamouni L. H., Kuhn T. B., 2021. Cofilin and Actin Dynamics: Multiple Modes of Regulation and Their Impacts in Neuronal Development and Degeneration. *Cells.* 10 (10): 2726.

Banka S., Bennington A., Baker M. J., Rijckmans E., Clemente G. D., Anzor N. M., Sito H., Prasad P., Anyane-Yeboah K., Badalato L., Dimitrov B., Fitzpatrick D., Hurst A. C. E., Jansen A. C., Kelly M. A., Krantz I., Rieubland C., Ross M., Rudy N. L., Sanz J., Stouffs K., Xu Z. L., Malliri A., Kazanietz M. G., Millard T. H., 2022. Activating RAC1 variants in the switch II region cause a developmental syndrome and alter neuronal morphology. *Brain.* awac049.

Benink H. A., Bement W. M., 2005. Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *J. Cell Biol.* 168: 429-439.

Bishop A. L., Hall A., 2000. Rho gtpases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348: 241-255.

- Borg M.**, Mittag T., Pawson T., Tyers M., Forman-Kay J. D., Chan H. S., 2007. Polyelectrostatic interactions of disordered ligands suggest a physical basis for ultrasensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 (23): 9650-9655.
- Boubaker C.**, Hsairi-Guidara I., Castro C., Ayadi I., Boyer A., Kerkeni E., Courageot J., Abid I., Bernard R., Bonello-Palot N., Kamoun F., Cheikh H. B., Lévy N., Triki C., Delague V., 2013. A novel mutation in FGD4/FRABIN causes charcot marie tooth disease type 4H in patients from a consanguineous Tunisian family. *Ann. Hum. Genet.* 77 (4): 336–343.
- Boulter E.**, Garcia-Mata R., Guilluy C., Dubash A., Rossi G., Brennwald P. J., Burridge K., 2010. Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol.* 12: 477–483.
- Brakebusch C.**, 2021. Rho GTPase Signaling in Health and Disease: A Complex Signaling Network. *Cells.* 10 (2): 401.
- Bravo-Cordero J. J.**, Oser M., Chen X., Eddy R., Hodgson L., Condeelis J., 2011. A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr. Biol.* 21: 635–644.
- Casalia M. L.**, Casabona J. C, García C., Cavaliere Candedo V., Quintá H. R., Farías M. I., Gonzalez J., Gonzalez Morón D., Córdoba M., Consalvo D., Mostoslavsky G., Urbano F. J., Pasquini J., Murer M. G., Rela L., Kauffman M. A., Pitossi F. J., 2021. A familiar study on self-limited childhood epilepsy patients using hiPSC-derived neurons shows a bias towards immaturity at the morphological, electrophysiological and gene expression levels. *Stem Cell Res Ther.* 12 (1): 590.
- Castelletto V.**, Ryumin P., Cramer R., Hamley I. W., Taylor M., Allsop D., Reza M., Ruokolainen J., Arnold T., Hermida-Merino D., Garcia C. I., Leal M. C., Castaño E., 2017. Self-Assembly and Anti-Amyloid Cytotoxicity Activity of Amyloid beta Peptide Derivatives. *Sci Rep.* 7:43637.
- Chan C.**, Beltzner C. C., Pollard T.D., 2009. Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr Biol.* 19: 537–545.
- Cheever T. R.**, Ervasti J. M., 2013. Actin isoforms in neuronal development and function. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 301: 157-213.
- Chen H.**, Bernstein B. W., Sneider J. M., Boyle J. A., Minamide L. S., Bamburg J. R., 2004. In Vitro Activity Differences between Proteins of the ADF/Cofilin Family Define Two Distinct Subgroups. *Biochemistry.* 43: 7127–7142.
- Chen X.**, Macara I. G., 2005. Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nature Cell Biol.* 7: 262–269.
- Cherfils J.**, Zeghouf M., 2013. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev.* 93 (1): 269-309.
- Chou F. S.**, Wang P. S., 2016. The Arp2/3 complex is essential at multiple stages of neural development. *Neurogenesis (Austin).* 3 (1): e1261653.
- Cikos S.**, Bukovská A., Koppel J., 2007. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol.* 8: 113.
- Coles C. H.**, Bradke F., 2015. Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Curr. Biol.* 25 (15): R677-691.

- Compagnucci C.**, Piemonte F., Sferra A., Piermarini E., Bertini E., 2016. The cytoskeletal arrangements necessary to neurogenesis. *Oncotarget*. 7 (15): 19414–19429.
- Cook D. R.**, Rossman K. L., Der C. J., 2014. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*. 33 (31): 4021–4035.
- Craig A.M.**, Banker G., 1994. Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 267-310.
- Daubon T.**, Buccione R., Génot, E., 2011. The Aarskog–Scott syndrome protein Fgd1 regulates podosome formation and extracellular matrix remodeling in transforming growth factor β -stimulated aortic endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 31 (22): 4430–4441.
- de Curtis I.**, 2008. Functions of Rac GTPases during neuronal development. *Dev Neurosci.* 30 (1-3): 47-58.
- De La Cruz E. M.**, 2009. How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev.* 1: 51–59.
- Delague V.**, Jacquier A., Hamadouche T., Poitelon Y., Baudot C., Boccaccio I., Chouery E., Chaouch M., Kassouri N., Jabbour R., Grid D., Mégarbané A., Haase G., Lévy N., 2007. Mutations in FGD4 encoding the Rho GDP/GTP exchange factor FRABIN cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4H. *Am. J. Hum. Genet.* 81 (1): 1–16.
- Delorme V.**, Machacek M., DerMardirossian C., Anderson K. L., Wittmann T., Hanein D., Waterman-Storer C., Danuser G., Bokoch G. M., 2007. Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks. *Dev. Cell.* 13: 646-662.
- Devreotes P.**, Horwitz A. R., 2015. Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a005959.
- Didsbury J.**, Weber R. F., Bokoch G. M., Evans T., Snyderman R., 1989. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem.* 264 (28): 16378-16382.
- Dominguez R.**, Holmes K. C., 2011. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 40: 169-186.
- Dosztányi Z.**, Csizmók V., Tompa P., Simon I., 2005. The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J. Mol. Biol.* 347 (4): 827-839.
- Duman J. G.**, Blanco F. A., Cronkite C. A., Ru Q., Erikson K. C., Mulherkar S., Saifullah A. B., Firozi K., Tolia K. F., 2021. Rac-maninoff and Rho-vel: The symphony of Rho-GTPase signaling at excitatory synapses. *Small GTPases.* 1-34.
- Dunker A. K.**, Cortese M. S., Romero P., Iakoucheva L. M., Uversky V. N., 2005. Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J.* 272 (20): 5129-5148.
- Dyson H. J.**, 2016. Making Sense of Intrinsically Disordered Proteins. *Biophys J.* 110 (5): 1013-1016.
- Dyson H. J.**, Wright P.E., 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6 (3): 197-208.

- Eitzen** G., Smithers C. C, Murray A. G, Overduin M., 2019. Structure and Function of the Fgd Family of Divergent FYVE Domain Proteins. *Biochem. Cell. Biol.* 97 (3): 257-264.
- Evsenko** D., Zhu Y., Schenke-Layland K., Kuo J., Latour B., Ge S., Scholes J., Dravid G., Li X., MacLellan W. R., Crooks G. M., 2010. Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (31): 13742-13747.
- Falco-Walter** J., 2020. Epilepsy-Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Semin Neurol.* 40 (6): 617-623.
- Farhan** M. A., Azad A. K., Touret N., Murray A. G., 2017. FGD5 regulates VEGF receptor-2 coupling to PI3 kinase and receptor recycling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37(12): 2301–2310.
- Fisher** R. S., Acevedo C., Arzimanoglou A., Bogacz A., Cross J. H., Elger C. E., Engel J. Jr, Forsgren L., French J. A., Glynn M., Hesdorffer D. C., Lee B. I., Mathern G. W., Moshé S. L., Perucca E., Scheffer I. E., Tomson T., Watanabe M., Wiebe S., 2014. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 55 (4): 475-82.
- Fletcher**, D. A., Mullins, R. D., 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485-492.
- Flock** T., Weatheritt R. J., Latysheva N. S., Babu M. M., 2014. Controlling entropy to tune the functions of intrinsically disordered regions. *Curr Opin Struct Biol.* 26: 62-72.
- Fritz** R.D., Letzelter M., Reimann A., Martin K., Fusco L., Ritsma L., Ponsioen B., Fluri E., Schulte-Merker S., van Rheenen J., Pertz O., 2013. A versatile toolkit to produce sensitive FRET biosensors to visualize signaling in time and space. *Sci. Signal.* 6, rs12.
- Garvalov** B. K., Flynn K. C., Neukirchen D., Meyn L., Teusch N., Wu X., Brakebusch C., Bamberg J. R., Bradke F., 2007. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J. Neurosci.* 27 (48): 13117-13129.
- GBD** 2016 Neurology Collaborators, 2019. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18 (5): 459-480.
- Genot** E., Daubon T., Sorrentino V., Buccione R., 2012. FGD1 as a central regulator of extracellular matrix remodelling--lessons from faciogenital dysplasia. *J. cell. Sci.* 125: 3265–3270.
- Giang** Ho T. T., Merajver S. D., Lapière C. M., Nusgens B. V., Deroanne C. F., 2008. RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGD1alpha. *J Biol Chem.* 283: 21588–21598.
- Goley** E. D., Rodenbusch S. E., Martin A. C., Welch M. D., 2004. Critical Conformational Changes in the Arp2/3 Complex Are Induced by Nucleotide and Nucleation Promoting Factor. *Mol. Cell.* 16 (2): 269-279.
- Goley** E. D., Welch M. D., 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 713–726.
- Goley** E. D., Rammohan A., Znameroski E. A., Firat-Karalar E. N., Sept D., Welch M. D., 2010. An actin-filament-binding interface on the Arp2/3 complex is critical for nucleation and branch stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 8159–8164.

- Gomez T. M., Letourneau P. C., 2014.** Actin dynamics in growth cone motility and navigation. *J. Neurochem.* 129: 221–234.
- Gonzalez-Billault C., Muñoz-Llancao P., Henriquez D. R., Wojnacki J., Conde C., Caceres A., 2012.** The Role of Small GTPases in Neuronal Morphogenesis and Polarity. *Cytoskeleton.* 69: 464–485.
- Graessl M., Koch J., Calderon A., Kamps D., Banerjee S., Mazel T., Schulze N., Jungkurth J. K., Patwardhan R., Solouk D., Hampe N., Hoffmann B., Dehmelt L., Nalbant P., 2017.** An excitable Rho GTPase signaling network generates dynamic subcellular contraction patterns. *J. Cell Biol.* 216: 4271–4285.
- Gsponer J., Babu M. M., 2009.** The rules of disorder or why disorder rules. *Prog Biophys Mol Biol.* 99 (2-3): 94-103.
- Guilluy C., Garcia-Mata R., Burridge K., 2011.** Rho protein crosstalk: another social network?. *Trends Cell Biol.* 21: 718–726.
- Guo D., Yang X., Shi L., 2020.** Rho GTPase Regulators and Effectors in Autism Spectrum Disorders: Animal Models and Insights for Therapeutics. *Cells.* 9 (4): 835.
- Gurok U., Steinhoff C., Lipkowitz B., Ropers H. H., Scharff C., Nuber U. A., 2004.** Gene expression changes in the course of neural progenitor cell differentiation. *J Neurosci.* 24 (26): 5982-6002.
- Hall A., 1998.** Rho gtpases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279: 509–514.
- Hayakawa M., Matsushima M., Hagiwara H., Oshima T., Fujino T., Ando K., Kikugawa K., Tanaka H., Miyazawa K., Kitagawa M., 2008.** Novel insights into FGD3, a putative GEF for Cdc42, that undergoes SCF(FWD1/Beta-TrCP)-mediated proteasomal degradation analogous to that of its homologue FGD1 but regulates cell morphology and motility differently from FGD1. *Genes Cells.* 13 (4): 329–342.
- Heasman S. J., Ridley A. J., 2008.** Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9 (9): 690-701.
- Hedrick N. G., Yasuda R., 2017.** Regulation of Rho GTPase proteins during spine structural plasticity for the control of local dendritic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 45: 193-201.
- Heldin J., O’Callaghan P., Hernández Vera R., Fuchs P. F., Gerwins P., Kreuger J., 2017.** FGD5 sustains vascular endothelial growth factor A (VEGFA) signaling through inhibition of proteasome-mediated VEGF receptor 2 degradation. *Cell. Signal.* 40: 125–132.
- Hernández-García R., Iruela-Arispe M. L., Reyes-Cruz G., Vázquez-Prado J., 2015.** Endothelial RhoGEFs: a systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells. *Vasc. Pharmacol.* 74: 60–72.
- Higgs H. N., Pollard T. D., 2001.** Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 649–676.
- Hlushchenko I., Koskinen M., Hotulainen P., 2016.** Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton.* 73(9):435-41.

- Ho M.**, Yang E., Matcuk G., Deng D., Sampas N., Tsalenko A., Tabibiazar R., Zhang Y., Chen M., Talbi S., Dong Ho Y., Wang J., Tsao P. S., Ben-Dor A., Yakhini Z., Bruhn L., Quertermous T., 2003. Identification of endothelial cell genes by combined database mining and microarray analysis. *Physiol. Genomics*. 13 (3): 249–262.
- Hohmann T.**, Dehghani F., 2019. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells*. 8 (4): 362.
- Hornbeck P. V.**, Zhang B., Murray B., Kornhauser J. M., Latham V., Skrzypek E., 2015. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic. Acids. Res.* 43: D512-520.
- Hou P.**, Estrada L., Kinley A. W., Parsons J. T., Vojtek A. B., Gorski J. L., 2003. Fgd1, the Cdc42 GEF responsible for faciogenital dysplasia, directly interacts with cortactin and MAbp1 to modulate cell shape. *Hum. Mol. Genet.* 12 (16): 1981–1993.
- Huang L.**, Zhang H., Cheng C. Y., Wen F., Tam P. O. S., Zhao P., Chen H., Li Z., Chen L., Tai Z., Yamashiro K., Deng S., Zhu X., Chen W., Cai L., Lu F., Li Y., Cheung C. G., Shi Y., Miyake M., Lin Y., Gong B., Liu X., Sim K., Yang J., Mori K., Zhang X., Cackett P. D., Tsujikawa M., Nishida K., Hao F., Ma S., Lin H., Cheng J., Fei P., Lai T. Y. Y., Tang S., Laude A., Inoue S., Yeo I. Y., Sakurada Y., Zhou Y., Iijima H., Honda S., Lei C., Zhang L., Zheng H., Jiang D., Zhu X., Wong T., Khor C., Pang C., Yoshimura N., Yang Z., 2016. A Missense Variant in FGD6 Confers Increased Risk of Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Nat. Genet.* 48 (6): 640-647.
- Huber C.**, Mårtensson A., Bokoch G. M., Nemazee D., Gavin A. L., 2008. FGD2, a CDC42-specific Exchange Factor Expressed by Antigen-Presenting Cells, Localizes to Early Endosomes and Active Membrane Ruffles. *J. Biol. Chem.* 283 (49): 34002-3412.
- Hyun Y. S.**, Lee J., Kim H. J., Hong Y. B., Koo H., Smith A. S. T., Kim D. H., Choi B. O., Chung K. W., 2015. Charcot–Marie–Tooth disease type 4H resulting from compound heterozygous mutations in FGD4 from nonconsanguineous Korean families. *Ann. Hum. Genet.* 79 (6): 460–469.
- Iakoucheva L. M.**, Brown C. J., Lawson J. D., Obradović Z., Dunker A. K., 2002. Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J. Mol. Biol.* 323 (3): 573-584.
- Iden S.**, Collard J. G., 2008. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9 (11): 846-59.
- Itoh R. E.**, Kurokawa K., Ohba Y., Yoshizaki H., Mochizuki N., Matsuda M., 2002. Activation of Rac and Cdc42 Video Imaged by Fluorescent Resonance Energy Transfer-Based Single-Molecule Probes in the Membrane of Living Cells. *Mol. Cell. Biol.* 22 (18): 6582–6591.
- Kalpachidou T.**, Spiecker L., Kress M., Quarta S., 2019. Rho GTPases in the Physiology and Pathophysiology of Peripheral Sensory Neurons. *Cells*. 8 (6): E591.
- Kapitein L.C.**, Hoogenraad C.C., 2011. Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 46 (1): 9-20.
- Kapitein L.C.**, Hoogenraad C.C., 2015. Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron*. 87 (3): 492-506.

- Kim I. H., Racz B., Wang H., Burianek L., Weinberg R., Yasuda R., Wetsel W. C., Soderling S. H., 2013.** Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities. *J. Neurosci.* 33 (14): 6081-6092.
- Kim J. J., Khalid O., Namazi A., Tu T. G., Elie O., Lee C., Kim Y., 2014.** Discovery of consensus gene signature and intermodular connectivity defining self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 32 (6): 1468-1479.
- Kim K., Hou P., Gorski J. L., Cooper J. A., 2004.** Effect of Fgd1 on cortactin in Arp2/3 complex-mediated actin assembly. *Biochemistry.* 43 (9): 2422-2427.
- Kim P. M., Sboner A., Xia Y., Gerstein M., 2008.** The role of disorder in interaction networks: a structural analysis. *Mol Syst Biol.* 4: 179.
- Kim Y., Ikeda W., Nakanishi H., Tanaka Y., Takekuni K., Itoh S., Monden M., Takai Y., 2002.** Association of frabin with specific actin and membrane structures. *Genes Cells.* 7 (4): 413-420.
- Klein K. M., Pendziwiat M., Eilam A., Gilad R., Blatt I., Rosenow F., Kanaan M., Helbig I., Afawi Z., Israeli-Palestinian Epilepsy Family Consortium., 2017.** The phenotypic spectrum of ARHGGEF9 includes intellectual disability, focal epilepsy and febrile seizures. *J. Neurol.* 264 (7): 1421-1425.
- Korobova F., Svitkina T., 2010.** Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 21 (1): 165-176.
- Kovaleva T. F., Maksimova N. S., Zhukov I. Y., Pershin V. I., Mukhina I. V., Gainullin M. R., 2019.** Cofilin: Molecular and Cellular Functions and Its Role in the Functioning of the Nervous System. *Neurochem. J.* 13: 11-19.
- Kuhn T. B., Meberg P. J., Brown M. D., Bernstein B. W., Minamide L. S., Jensen J. R., Okada K., Soda E. A., Bamburg J. R., 2000.** Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *J Neurobiol.* 44: 126-144.
- Kurusu S., Takenawa T., 2009.** The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biol.* 10 (6): 226.
- Kurogane Y., Miyata M., Kubo Y., Nagamatsu Y., Kundu R. K., Uemura A., Ishida T., Quertermous T., Hirata K., Rikitake Y., 2012.** FGD5 mediates pro angiogenic action of vascular endothelial growth factor in human vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (4): 988-996.
- Kylmaoja E., Nakamura M., Tuukkanen J., 2016.** Osteoclasts and remodeling based bone formation. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 11 (8): 626-633.
- Laboy Cintron D., Muir A. M., Scott A., McDonald M., Monaghan K. G., Santiago-Sim T., Wentzensen I. M., De Luca C., Italian Undiagnosed Diseases Network, Brancati F., Harris D. J., Goueli C., Stottmann R., Prada C. E., Biderman Waberski M., Mefford H. C., 2021.** A recurrent, de novo pathogenic variant in ARPC4 disrupts actin filament formation and causes microcephaly and speech delay. *HGG Adv.* 3 (1): 100072.

- LeClaire** L. L. 3rd, Baumgartner M., Iwasa J. H., Mullins R. D., Barber D. L., 2008. Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments. *J Cell Biol.* 182 (4): 647-654.
- Lee** C. W., Ferreón J. C., Ferreón A. C., Arai M., Wright P. E., 2010. Graded enhancement of p53 binding to CREB-binding protein (CBP) by multisite phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (45): 19290-19295.
- Lelieveld** S. H., Reijnders M. R., Pfundt R., Yntema H. G., Kamsteeg E. J., de Vries P., de Vries B. B., Willemsen M. H., Kleefstra T., Löhner K., Vreeburg M., Stevens S. J., van der Burgt I., Bongers E. M., Stegmann A. P., Rump P., Rinne T., Nelen M. R., Veltman J. A., Vissers L. E., Brunner H. G., Gilissen C., 2016. Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nat Neurosci.* 19 (9): 1194-1196.
- Lim** J., Yue Z., 2015. Neuronal aggregates: formation, clearance, and spreading. *Dev Cell.* 32 (4): 491-501.
- Lippi** G., Steinert J. R., Marczylo E. L., D'Oro S., Fiore R., Forsythe I. D., Schratz G., Zoli M., Nicotera P., Young K. W., 2011. Targeting of the Arpc3 actin nucleation factor by miR-29a/b regulates dendritic spine morphology. *J. Cell. Biol.* 194 (6): 889-904.
- Liu** Y., Wang X., Liu B., 2019. A comprehensive review and comparison of existing computational methods for intrinsically disordered protein and region prediction. *Brief Bioinform.* 20 (1): 330-346.
- Lowery** LA, Van Vactor D., 2009. The trip of the tip: understanding the growth cone machiner. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10 (5): 332–343.
- Luo** L., 2002. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 601-635.
- Maciver** S. K., Hussey P. J., 2002. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol.* 3 (5): reviews 3007.
- Machacek** M., Hodgson L., Welch C., Elliott H., Pertz O., Nalbant P., Abell A., Johnson G. L., Hahn K. M., Danuser G., 2009. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature.* 461: 99–103.
- Maekawa** M., Ishizaki T., Boku S., Watanabe N., Fujita A., Iwamatsu A., Obinata T., Ohashi K., Mizuno K., Narumiya S., 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 285: 895–898.
- Maglorius Renkilaraj** M. R. L., Baudouin L., Wells C. M., Doulazmi M., Wehrlé R., Cannaya V., Bachelin C., Barnier J. V., Jia Z., Nait Oumesmar B., Dusart I., Bouslama-Oueghlani L., 2017. The intellectual disability protein PAK3 regulates oligodendrocyte precursor cell differentiation. *Neurobiol. Dis.* 98: 137-148.
- Marchand** J. B., Kaiser D. A., Pollard T. D., Higgs H. N., 2001. Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* 3: 76.
- Marei** H., Malliri A., 2017. Rac1 in human diseases: The therapeutic potential of targeting Rac1 signaling regulatory mechanisms. *Small GTPases.* 8 (3):139–163.
- Marinissen** M. J., Gutkind J. S., 2005. Scaffold proteins dictate Rho GTPase-signaling specificity. *Trends Biochem Sci.* 30 (8): 423-426.

- Matsuda J.**, Greenberg D., Ibrahim S., Maier M., Aoudjit L., Chapelle J., Baldwin C., He Y., Lamarche-Vane N., Takano T., 2022. CdGAP maintains podocyte function and modulates focal adhesions in a Src kinase-dependent manner. *Sci Rep.* 12 (1): 18657.
- Matsukawa T.**, Morita K., Omizu S., Kato S., Koriyama Y., 2018. Mechanisms of RhoA inactivation and CDC42 and Rac1 activation during zebrafish optic nerve regeneration. *Neurochem. Int.* 112: 71-80.
- McTague A.**, Howell K. B., Cross J. H., Kurian M. A., Scheffer I. E., 2016. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol.* 15 (3): 304-16.
- Mehidi A.**, Rossier O., Schaks M., Chazeau A., Binamé F., Remorino A., Coppey M., Karatas Z., Sibarita J. B., Rottner K., Moreau V., Giannone G., 2019. Transient Activations of Rac1 at the Lamellipodium Tip Trigger Membrane Protrusion. *Curr Biol.* 29 (17): 2852-2866.e5.
- Melcon M. O.**, Kochen S., Vergara R. H., 2007. Prevalence and clinical features of epilepsy in Argentina. A community-based study. *Neuroepidemiology.* 28 (1): 8-15.
- Mertens A. E.**, Roovers R. C., Collard J. G., 2003. Regulation of Tiam1–Rac signalling. *FEBS Lett.* 546: 11–16.
- Mertens A. E.**, Rygiel T. P., Olivo C., van der Kammen, R., Collard J. G., 2005. The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J. Cell Biol.* 170: 1029–1037.
- Mészáros B.**, Erdos G., Dosztányi Z., 2018. IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Res.* 46 (W1): W329-W337.
- Mitin N.**, Betts L., Yohe M. E., Der C. J., Sondek J., Rossman K. L., 2007. Release of Autoinhibition of ASEF by APC Leads to CDC42 Activation and Tumor Suppression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (9): 814-823.
- Miyamoto Y.**, Yamauchi J., Itoh H., 2003. Src Kinase Regulates the Activation of a Novel FGD-1-related Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor in the Signaling Pathway From the Endothelin A Receptor to JNK. *J. Biol. Chem.* 278 (32): 29890-29900.
- Mizuno K.**, 2013. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell. Signal.* 25 (2): 457-469.
- Morgan T. E.**, Lockerbie R. O., Minamide L. S., Browning M. D., Bamburg J.R., 1993. Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J. Cell. Biol.* 122 (3): 623-633.
- Müller P. M.**, Rademacher J., Bagshaw R. D., Wortmann C., Barth C., van Unen J., Alp K. A., Giudice G., Eccles R. L., Heinrich L. E., Pascual-Vargas P., Sanchez-Castro M., Brandenburg L., Mbamalu G., Tucholska M., Spatt L., Czajkowski M. T., Welke R. W., Zhang S., Nguyen V., Rrustemi T., Trnka P., Freitag K., Larsen B., Popp O., Mertins P., Gingras A. C., Roth F. P., Colwill K., Bakal C., Pertz O., Pawson T., Petsalaki E., Rocks O., 2020. Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions. *Nat Cell Biol.* 22 (4): 498-511.

- Muñoz-Lasso** D. A., Romá-Mateo C., Pallardó F.V., Gonzalez-Cabo P., 2020. Much More Than a Scaffold: Cytoskeletal Proteins in Neurological Disorders. *Cells*. 9 (2): 358.
- Nagy** A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R., 2006. Differentiating Embryonic Stem (ES) Cells into Embryoid Bodies. *CSH protocols*.
- Nakanishi** H., Takai Y., 2008. Frabin and other related Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factors couple the actin cytoskeleton with the plasma membrane. *J. Cell. Mol. Med.* 12 (4): 1169-1176.
- Nakhaei-Nejad** M., Haddad G., Zhang Q. X., Murray A. G., 2012. Facio-genital dysplasia-5 regulates matrix adhesion and survival of human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (11): 2694–2701.
- Namme** J. N., Bepari A. K., Takebayashi H., 2021. Cofilin Signaling in the CNS Physiology and Neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (19): 10727.
- Narayanan** A., LeClaire L. L. 3rd, Barber D. L., Jacobson M. P., 2011. Phosphorylation of the Arp2 subunit relieves auto-inhibitory interactions for Arp2/3 complex activation. *PLoS Comput Biol.* 7 (11): e1002226.
- Nishimura** T., Yamaguchi T., Kato K., Yoshizawa M., Nabeshima Y., Ohno S., Hoshino M., Kaibuchi K., 2005. PAR-6–PAR-3 mediates Cdc42- induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/ Tiam1. *Nature Cell Biol.* 7: 270–277.
- Niftullayev** S., Lamarche-Vane N., 2019. Regulators of Rho GTPases in the Nervous System: Molecular Implication in Axon Guidance and Neurological Disorders. *Int J Mol Sci.* 20 (6): 1497.
- Niwa** R., Nagata-Ohashi K., Takeichi M., Mizuno K., Uemura T., 2002. Control of Actin Reorganization by Slingshot, a Family of Phosphatases That Dephosphorylate ADF/Cofilin. *Cell.* 108: 233–246.
- 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.
- Ono** Y., Nakanishi H., Nishimura M., Kakizaki M., Takahashi K., Miyahara M., Satoh-Horikawa K., Mandai K., Takai Y., 2000. Two actions of frabin: direct activation of Cdc42 and indirect activation of Rac. *Oncogene.* 19 (27): 3050–3058.
- Oldfield** C. J., Cheng Y., Cortese M. S., Romero P., Uversky V. N., Dunker A. K., 2005. Coupled folding and binding with alpha-helix-forming molecular recognition elements. *Biochemistry.* 44 (37): 12454-1270.
- Oldfield** C. J., Dunker A. K., 2014. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annu. Rev. Biochem.* 83: 553-584.
- Oliver** A. W., He X., Borthwick K., Donne A. J., Hampson L., Hampson I. N., 2011. The HPV16 E6 binding protein Tip-1 interacts with ARHGEF16, which activates Cdc42. *Br. J. Cancer.* 104 (2): 324-331.
- Oshima** T., Fujino T., Ando K., Hayakawa M., 2011. Role of FGD1, a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, in epidermal growth factor-stimulated c-Jun NH2-terminal kinase activation and cell migration. *Biol. Pharm. Bull.* 34 (1): 54–60.

- Ouyang** Y., Yang X. F., Hu X. Y., Erbayat-Altay E., Zeng L. H., Lee J. M., Wong M., 2007. Hippocampal seizures cause depolymerization of filamentous actin in neurons independent of acute morphological changes. *Brain Res.* 1143: 238-246.
- Padrick** S. B., Doolittle L. K., Brautigam C. A., King D. S., Rosen M. K., 2011. Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: E472–E479.
- Pancsa** R., Tompa P., 2012. Structural disorder in eukaryotes. *PLoS One.* 7 (4): e34687.
- Park** S., Guo Y., Negre J., Preto J., Smithers C. C., Kalam Azad A., Overduin M., Murray A. G., Eitzen G., 2021. Fgd5 Is a Rac1-specific Rho GEF That Is Selectively Inhibited by Aurintricarboxylic Acid. *Small GTPases.* 1-14.
- Pasteris** N. G., Cadle A., Logie L. J., Porteous M. E., Schwartz C. E., Stevenson R. E., Glover T. W., Wilroy R. S., Gorski J. L., 1994. Isolation and Characterization of the Faciogenital Dysplasia (Aarskog-Scott Syndrome) Gene: A Putative Rho/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor. *Cell.* 79 (4): 669-678.
- Pasteris** N. G., Nagata K., Hall A., Gorski J. L., 2000. Isolation, characterization, and mapping of the mouse *Fgd3* gene, a new faciogenital dysplasia (FGD1; Aarskog Syndrome) gene homologue. *Gene.* 242 (1–2): 237–247.
- Pertz** O., 2010. Spatio-temporal Rho GTPase signaling—where are we now?. *J. Cell Sci.* 123: 1841–1850.
- Perucca** P., Scheffer I. E., Kiley M., 2018 The management of epilepsy in children and adults. *Med J Aust.* 2018 Mar 19;208(5):226-233. doi: 10.5694/mja17.00951. PMID: 29540143.
- Pollard** T.D., Mooseker M.S., 1981. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J Cell Biol.* 88, 654-659.
- Pollard** T. D., Cooper J. A, 2009. Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science.* 326(5957):1208-12.
- Pollard** T.D., 2016. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8: 1–17.
- Pontius** B. W., 1993. Close encounters: why unstructured, polymeric domains can increase rates of specific macromolecular association. *Trends Biochem Sci.* 18 (5): 181-186.
- Preis** P. N., Saya H., Nádasdi L., Hochhaus G., Levin V., Sadée W., 1998. Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. *Cancer. Res.* 48 (22): 6530-6534.
- Pufall** M.A., Graves B. J., 2002. Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18: 421-462.
- Pyronneau** A, He Q, Hwang JY, Porch M, Contractor A, Zukin RS. Aberrant Rac1-cofilin signaling mediates defects in dendritic spines, synaptic function, and sensory perception in fragile X syndrome. *Sci Signal.* 2017 Nov 7;10(504): ean0852.

- Ramakers** G. J., Wolfer D., Rosenberger G., Kuchenbecker K., Kreienkamp H. J., Prange-Kiel J., Rune G., Richter K., Langnaese K., Masneuf S., Bösl M. R., Fischer K. D., Krugers H. J., Lipp H. P., van Galen E., Kutsche K., 2012. Dysregulation of Rho GTPases in the α Pix/Arhgef6 mouse model of X-linked intellectual disability is paralleled by impaired structural and synaptic plasticity and cognitive deficits. *Hum. Mol. Genet.* 21 (2): 268-286.
- Reijnders** M. R. F., Ansor N. M., Kousi M., Yue W. W., Tan P. L., Clarkson K., Clayton-Smith J., Corning K., Jones J. R., Lam W. W. K., Mancini G. M. S., Marcelis C., Mohammed S., Pfundt R., Roifman M., Cohn R., Chitayat D., Deciphering Developmental Disorders Study, Millard T. H., Katsanis N., Brunner H. G., Banka S., 2017. RAC1 Missense Mutations in Developmental Disorders with Diverse Phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 101 (3): 466-477.
- Reinhard** N. R., Van Der Niet S., Chertkova A., Postma M., Hordijk P. L., Gadella T. W. J. Jr, Goedhart J., 2021. Identification of guanine nucleotide exchange factors that increase Cdc42 activity in primary human endothelial cells. *Small GTPases.* 12 (3): 226-240.
- Ressad** F., Didry D., Xia G. X., Hong Y., Chua N. H., Pantaloni D., Carlier M. F., 1998. Kinetic Analysis of the Interaction of Actin-Depolymerizing Factor (ADF)/Cofilin with G- and F-Actins. Comparison of Plant and Human ADFs and Effect of Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 273: 20894–20902.
- Ridley** A. J., Paterson H. F., Johnston C. L., Diekmann D., Hall A., 1992. The small gtp-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70: 401–410.
- Riento** K., Ridley A. J., 2003. ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4 (6): 446-456.
- Robinson** R. C., Turbedsky K., Kaiser D. A., Marchand J. B., Higgs H. N., Choe S., Pollard T. D., 2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science.* 294: 1679–1684.
- Robinson** S. J., 2012. Childhood epilepsy and autism spectrum disorders: psychiatric problems, phenotypic expression, and anticonvulsants. *Neuropsychol Rev.* 22 (3): 271-279.
- Rojas** R. J., Yohe M. E., Gershburg S., Kawano T., Kozasa T., Sondek J., 2007. $G\alpha_q$ directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated Pleckstrin homology domain. *J. Biol. Chem.* 282: 29201–29210.
- Rosário** M., Franke R., Bednarski C., Birchmeier W., 2007. The neurite outgrowth multiadaptor RhoGAP, NOMA-GAP, regulates neurite extension through SHP2 and Cdc42. *J. Cell. Biol.* 178: 503–516.
- Rossman** K. L., Worthylake D. K., Snyder J. T., Siderovski D. P., Campbell S. L., Sondek J., 2002. A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain assisted guanine nucleotide exchange. *EMBO J.* 21: 1315–1326.
- Rossman** K. L., Der C. J., Sondek J., 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6 (2): 167-180.

- Rouiller I.**, Xu X. P., Amann K. J., Egile C., Nickell S., Nicastro D., Li R., Pollard T. D., Volkman N., Hanein D., 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 180: 887–895.
- Rudolf G.**, de Bellescize J., de Saint Martin A., Arzimanoglou A., Valenti Hirsch M. P., Labalme A., Boulay C., Simonet T., Boland A., Deleuze J. F., Nitschké P., Ollivier E., Sanlaville D., Hirsch E., Chelly J., Lesca G., 2020. Exome sequencing in 57 patients with self-limited focal epilepsies of childhood with typical or atypical presentations suggests novel candidate genes. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 27: 104-110.
- Sánchez-Carpintero R.**, 2010. Variabilidad de la evolución cognitiva en los distintos tipos de epilepsia del niño [Variability of cognitive development in different types of epilepsy in children]. *Rev Neurol.* 50 Suppl 3: S31-36. Spanish.
- Schaefer A.**, Reinhard N. R., Hordijk P. L., 2014. Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. *Small GTPases.* 5 (2): 6.
- Scheffer I. E.**, Berkovic S., Capovilla G., Connolly M. B., French J., Guilhoto L., Hirsch E., Jain S., Mathern G. W., Moshé S. L., Nordli D. R., Perucca E., Tomson T., Wiebe S., Zhang Y. H., Zuberi S. M., 2017. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 58 (4): 512-521.
- Schelski M.**, Bradke F., 2017. Neuronal polarization: From spatiotemporal signaling to cytoskeletal dynamics. *Mol Cell Neurosci.* 84:11-28.
- Schuele S. U.**, Lüders H. O., 2008. Intractable epilepsy: management and therapeutic alternatives. *Lancet Neurol.* 7 (6): 514-524.
- Schuster S.**, Rivalan M., Strauss U., Stoenica L., Trimbuch T., Rademacher N., Parthasarathy S., Lajkó D., Rosenmund C., Shoichet S. A., Winter Y., Tarabykin V., Rosário M., 2015. NOMA-GAP/ARHGAP33 regulates synapse development and autistic-like behavior in the mouse. *Mol. Psychiatry.* 20: 1120–1131.
- Scott C. I.**, 1971. Unusual facies, joint hypermobility, genital anomaly and short stature: a new dysmorphic syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 7 (6): 240-246.
- Scott R. W.**, Olson M. F., 2007. LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J. Mol. Med.* 85: 555–568.
- Sept D.**, Elcock A.H., McCammon J.A., 1999. Computer simulations of actin polymerization can explain the barbed-pointed end asymmetry. *J. Mol. Biol.* 294: 1181–1189.
- Sidell N.**, Altman A., Haussler M. R., Seeger R. C., 1983. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp. Cell. Res.* 148 (1): 21-30.
- Sit S. T.**, Manser E., 2011. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 124 (Pt 5): 679-683.
- Smith B. A.**, Padrick S. B., Doolittle L. K., Daugherty-Clarke K., Corrêa Jr I. R., Xu M. Q., Goode B. L., Rosen M. K., Gelles J., 2013. Three-color single molecule imaging shows WASP detachment from Arp2/3 complex triggers actin filament branch formation. *Elife.* 2: e01008.

- Snyder** J. T., Worthylake D. K., Rossman K. L., Betts L., Pruitt W. M., Siderovski D. P., Der C. J., Sondek J., 2002. Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat. Struct. Biol.* 9 (6): 468-75.
- Soosairajah** J., Maiti S., Wiggan O., Sarmiere P., Moussi N., Sarcevic B., Sampath R., Bamburg J. R., Bernard O., 2005. Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J.* 24 (3): 473-486.
- Spence** E. F., Kanak D. J., Carlson B. R., Soderling S. H., 2016. The Arp2/3 Complex Is Essential for Distinct Stages of Spine Synapse Maturation, Including Synapse Unsilencing. *J Neurosci.* 2016 Sep 14;36(37):9696-709.
- Spillane** M., Gallo G., 2014. Involvement of Rho-family GTPases in axon branching. *Small GTPases.* 5: e27974.
- Spudich** J.A., Huxley H.E., Finc, J.T., 1972. Regulation of skeletal muscle contraction. II. Structural studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin. *J. Mol. Biol.* 72, 619-632.
- Stankiewicz** T. R., Linseman D. A., 2014. Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Front. Cell Neurosci.* 8: 314.
- Steenblock** C., Heckel T., Czupalla C., Espírito Santo A. I., Niehage C., Sztacho M., Hoflack B., 2014. The Cdc42 guanine nucleotide exchange factor FGD6 coordinates cell polarity and endosomal membrane recycling in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 289 (26): 18347–18359.
- Stein** A., Pache R. A., Bernadó P., Pons M., Aloy P., 2009. Dynamic interactions of proteins in complex networks: a more structured view. *FEBS J.* 276 (19): 5390-5405.
- Strasheim** D., Gerasimovskaya E., Irwin D., Dempsey E. C., Stenmark K., Karoor V., 2019. RhoGTPase in Vascular Disease. *Cells.* 8 (6): 551.
- Svitkina** T. M., 2018. Actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10.1101/cshperspect.a018267.
- Symonds** J. D., Zuberi S. M., Johnson M. R., 2017. Advances in epilepsy gene discovery and implications for epilepsy diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Neurol.* 30 (2): 193-199.
- Tahirovic** S., Hellal F., Neukirchen D., Hindges R., Garvalov B. K., Flynn K. C., Stradal T. E., Chrostek-Grashoff A., Brakebusch C., Bradke F., 2010. Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. *J Neurosci.* 30 (20): 6930-6943.
- Tang** W., Cai P., Huo W., Li H., Tang J., Zhu D., Xie H., Chen P., Hang B., Wang S., Xia Y., 2016. Suppressive action of miRNAs to ARP2/3 complex reduces cell migration and proliferation via RAC isoforms in Hirschsprung disease. *J. Cell. Mol. Med.* 20 (7): 1266–1275.
- Thiele** C. J., 1998. Neuroblastoma cells lines: molecular features. *Masters, J. Human Cell Culture.* Lancaster, U.K. Kluwer Academic Publishers. Vol 1: 21-53.
- Thongnak** C., Hnoonual A., Tangviriyapaiboon D., Silvilairat S., Puangpetch A., Pasomsub E., Chantratita W., Limprasert P., Sukasem C., 2018. Whole-Exome Sequencing Identifies One De Novo Variant in the FGD6 Gene in a Thai Family with Autism Spectrum Disorder. *Int. J. Genomics.* 2018: 8231547.

- Tokuraku K.**, Kuragano M., Uyeda T. Q. P., 2020. Long-Range and Directional Allostery of Actin Filaments Plays Important Roles in Various Cellular Activities. *Int J Mol Sci.* 21 (9): E3209.
- Tolias K. F.**, Duman J. G., Um K., 2011. Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Prog Neurobiol.* 94 (2): 133-148.
- Tompa P.**, 2012. Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends Biochem Sci.* 37 (12): 509-516.
- Trudeau T.**, Nassar R., Cumberworth A., Wong E. T. C., Woollard G., Gsponer J., 2013. Structure and intrinsic disorder in protein autoinhibition. *Structure.* 21 (3): 332-341.
- Umikawa M.**, Obaishi H., Nakanishi H., Satoh-Horikawa K., Takahashi K., Hotta I., Matsuura Y., Takai Y., 1999. Association of Frabin With the Actin Cytoskeleton Is Essential for Microspike Formation Through Activation of Cdc42 Small G Protein. *J. Biol. Chem.* 274 (36): 25197-25200.
- Urano T.**, Liu J., Zhang P., Fan Yx., Egile C., Li R., Mueller S. C., Zhan X., 2001. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol.* 3 (3): 259-266.
- Van Roey K.**, Gibson T. J., Davey N. E., 2012. Motif switches: decision-making in cell regulation. *Curr Opin Struct Biol.* 22 (3): 378-385.
- Wang P. S.**, Chou F. S., Ramachandran S., Xia S., Chen H. Y., Guo F., Suraneni P., Maher B. J., Li R., 2016. Crucial roles of the Arp2/3 complex during mammalian corticogenesis. *Development.* 143 (15): 2741-2752.
- Wang W.**, Townes-Anderson E., 2016. Lim kinase, a bi-functional effector in injury-induced structural plasticity of synapses. *Neural. Regen. Res.* 11: 1029–1032.
- Weitzdoerfer R.**, Fountoulakis M., Lubec G., 2002. Reduction of actin-related protein complex 2/3 in fetal Down syndrome brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 293 (2): 836-841.
- Wennerberg K.**, Der C. J., 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci.* 117 (Pt 8): 1301-1312.
- Wright P. E.**, Dyson H. J., 1999. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* 293 (2): 321-331.
- Wright P. E.**, Dyson H. J., 2015. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16 (1): 18-29.
- Xiong T.**, Liu J., Dai G., Hou Y., Tan B., Zhang Y., Li S., Song Y., Liu H., Li Y., Li Y., 2015. The progressive changes of filamentous actin cytoskeleton in the hippocampal neurons after pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsy Res.* 118: 55-67.
- Yang J.**, Gao M., Xiong J., Su Z., Huang Y., 2019. Features of molecular recognition of intrinsically disordered proteins via coupled folding and binding. *Protein Sci.* 28 (11): 1952-1965.
- Yang N.**, Higuchi O., Ohashi K., Nagata K., Wada A., Kangawa K., Nishida E., Mizuno K., 1998. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature.* 393 (6687):809-812.

- Yang N.**, Li Y. C., Xiong T. Q., Chen L. M., Zhai Y., Liang J. M., Hao Y. P., Ma D. H., Zhang Y. F., 2019. Dexamethasone ameliorates the damage of hippocampal filamentous actin cytoskeleton but is not sufficient to cease epileptogenesis in pilocarpine induced epileptic mice. *Epilepsy Res.* 154:26-33.
- Yang N.**, Zhang Y., Wang J. T., Chen C., Song Y., Liang J. M., Ma D. H., Zhang Y. F., 2020. Effects of Dexamethasone on Remodeling of the Hippocampal Synaptic Filamentous Actin Cytoskeleton in a Model of Pilocarpine-induced Status Epilepticus. *Int J Med Sci.* 17 (12): 1683-1691.
- Yasuda R.**, Nakahata Y., 2018. Plasticity of spine structure: Local signaling, translation, and cytoskeletal reorganization. *Front. Synaptic Neurosci.* 10: 29.
- Yu B.**, Martins I. R. S., Li P., Amarasinghe G. K., Umetani J., Fernandez-Zapico M. E., Billadeau D. D., Machius M., Tomchick D. R., Rosen M. K., 2010. Structural and energetic mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1. *Cell.* 140 (2): 246–256.
- Yuan A.**, Rao, M.V., Veeranna, Nixon, R.A., 2017. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9: a018309.
- Yung S.**, Ledran M., Moreno-Gimeno I., Conesa A., Montaner D., Dopazo J., Dimmick I., Slater N. J., Marenah L., Real P. J., Paraskevopoulou I., Bisbal V., Burks D., Santibanez-Koref M., Moreno R., Mountford J., Menendez P., Armstrong L., Lako M., 2011. Large-scale transcriptional profiling and functional assays reveal important roles for Rho-GTPase signalling and SCL during haematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet.* 20 (24): 4932-4946.
- Zamboni V.**, Armentano M., Berto G., Ciralo E., Ghigo A., Garzotto D., Umbach A., DiCunto F., Parmigiani E., Boido M., Vercelli A., El-Assawy N., Mauro A., Priano L., Ponzoni L., Murru L., Passafaro M., Hirsch E., Merlo G.R., 2018. Hyperactivity of Rac1-GTPase pathway impairs neuritogenesis of cortical neurons by altering actin dynamics. *Sci Rep.* 8 (1): 7254.
- Zhao Z. S.**, Manser E., 2005. PAK and other Rho-associated kinases-effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem. J.* 386: 201-214.
- Zhao Z. S.**, Manser E., 2012. PAK family kinases: Physiological roles and regulation. *Cell Logist.* 2 (2): 59-68.
- Zheng Y.**, Fischer D. J., Santos M. F., Tigyi G., Pasteris N. G., Gorski J. L., Xu Y., 1996. The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 271: 33169–33172.