



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

**CARACTERITZACIÓ DELS RATOLINS *KNOCKIN*
CONDICIONAL DE PDK1 QUE EXPRESSEN LA
MUTACIÓ L155E A SISTEMA NERVIÓS CENTRAL**

Lluís Cordón Barris

TESI DOCTORAL

Bellaterra, 2015



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

CARACTERITZACIÓ DELS RATOLINS *KNOCKIN* CONDICIONAL DE PDK1 QUE EXPRESSEN LA MUTACIÓ L155E A SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

Memòria de tesi doctoral presentada per Lluís Cordón Barris a fi d'optar al grau de Doctor en Neurociències per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball s'ha realitzat en la Unitat de Bioquímica de la Facultat de Medicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. José Ramón Bayascas Ramírez.

Director de tesi,

Doctorand,

Dr. José Ramón Bayascas Ramírez

Lluís Cordón Barris

Bellaterra, 24 de Juliol del 2015

ÍNDEX

I. ÍNDEX	1
II. ABREVIATURES	7
III. RESUM	13
IV. INTRODUCCIÓ	17
1. Senyalització en el sistema nerviós central	17
1.1 Neurotrofines i els seus receptors neuronals	17
1.2 Vies de senyalització activables per neurotrofines	26
1.2.1 Via de la PLC- γ 1	27
1.2.2 Via de la Ras-MAPK	28
1.2.3 Via de la PI3K	30
1.3 Regulació de la via de la PI3K	35
1.4 Família de les AGC kinases	36
1.5 PDK1 i les quinases dependents del PIF-pocket	38
2. Supervivència i mort neuronal	44
2.1 Eix PI3K/PKB/GSK3 en la supervivència neuronal	46
2.2 El denominador comú d'SGK i PKB: FoXO	52
3. Creixement i diferenciació cel·lular: mTORC1	60
4. Desenvolupament neuronal	66
4.1 Neuritogènesi	67
4.2 Polarització	69
4.3 Sinaptogènesi	72
5. Mouse neocòrtex	74
5.1 Migració neuronal	74
5.1.1 Migració Radial i Corticogènesi	75
5.1.2 Migració tangencial	77
6. Malalties associades a defectes en la migració neuronal	79
7. Història i evolució dels models animals de PDK1	84
V. OBJECTIUS	97

VI. MATERIAL I MÈTODES	101
1 Model animal	101
2 Anàlisi genètic	101
2.1 Aproximació genòmica de l'expressió de la mutació L155E de PDK1	101
2.2 Genotipatge	103
3 Cultius primaris de neurones de ratolí	103
3.1 Generació de cultius primaris de neurones	103
3.2 Tractaments dels cultius primaris	106
3.3 Avaluació de la supervivència i mort neuronal	107
3.3.1 Assaig de MTT per la viabilitat neuronal	107
3.3.2 Quantificació de l'apoptosi neuronal	108
4 Generació d'extractes proteics	108
4.1 Extractes proteics procedents de cultius primaris de neurones	108
4.2 Extractes proteics procedents de teixits	109
5 Western Blotting	109
5.1 Electroforesi en gels SDS-PAGE	109
5.2 Transferència i detecció proteica en membranes de nitrocel·lulosa	110
6 Purificació per afinitat de PDK1	112
7 Anticossos	112
8 Anàlisi morfològic	114
8.1 Immunocitoquímica	114
8.1.1 Avaluació de la diferenciació neuronal	115
8.2 Perfusió i inclusió dels cervells en parafina	116
8.3 Tinció hematoxil·lina-eosina (H-E)	116
8.4 Immunohistoquímica	117
8.4.1 Quantificació de la immunohistoquímica	118
9 Anàlisi de la conducta	119
10 Anàlisi estadístic	121

VII. RESULTATS	125
1. Generació del ratolí <i>knockin</i> condicional PDK1 L155E de sistema nerviós central	125
1.1 La mutació L155E inhabilita el domini PIF-pocket de PDK1	127
1.2 L'expressió de la proteïna mutant de PDK1 en ratolins PDK1 ^{-/-} Cre ⁻ no es deu a una inestabilitat genòmica del transgen	129
1.3 Penetrància bioquímica de la mutació PDK1 L155E en la via de la PI3K en ratolins adults	130
1.4 Microcefàlia i reducció del volum neuronal en els ratolins PDK1 ^{-/-} Cre ⁻ i PDK1 ^{-/-} Cre ⁺	132
2. La mutació en el PIF-pocket de PDK1 impedeix l'activació de S6K, RSK i SGK, però no de PKB	133
3. L'activació exclusiva de les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1 no és indispensable per les respostes de supervivència neuronal	136
3.1 L'efecte neuroprotector del BDNF no es veu significativament alterat en les neurones corticals PDK1 ^{-/-} Cre ⁺	136
3.2 La viabilitat neuronal depèn de la via de la PI3K a través de PDK1 i d'mTORC2	138
3.3 Sinèrgia d'SGK i de PKB en les respostes de supervivència neuronal	142
4. PDK1 promou el desenvolupament neuronal a través de les quinases dependents del seu domini PIF-pocket	145
4.1 mTORC2 i S6K es troben implicats en la polarització neuronal i l'elongació axonal	148
4.2 La via de la PI3K participa a través de S6K en la consolidació de la sinapsi	150

5. Alteració fisiològica en el cervell dels ratolins PDK1^{-/-}Cre⁻ i PDK1^{-/-}Cre⁺	153
5.1 Reducció en la densitat de fibres axonals del còrtex i de l'hipocamp	153
5.2 Compactació neuronal en la quarta capa del còrtex	155
5.3 Canvis en la distribució cortical d'algunes poblacions d'interneurons	158
5.4 Impacte de la mutació del PIF-pocket de PDK1 en l'activitat de les interneurons gabaèrgiques del còrtex somatosensorial i cingulat	161
6. Desordres cognitius i de conducta en ratolins PDK1^{-/-}Cre⁻ i PDK1^{-/-}Cre⁺	164
VIII. DISCUSSIÓ	169
IX. CONCLUSIONS	189
X. INTERÈS CIENTÍFIC	193
XI. PUBLICACIONS DERIVADES DE LA TESI	197
XII. BIBLIOGRAFIA	201
XIII. VISUAL ABSTRACT	237

ABREVIATURES

5'UTR	5' untranslated region	c-myc	c-myelocytomatosis oncogene
ADN	àcid desoxiribonucleic	CRE	Type I topoisomerase from P1 bacteriophage
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	CREB	cAMP-response element binding protein
AMPK	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase	CRK	CT10 Regulator of Kinase
AP-1	adaptor protein complex 1	CRTC	CREB-regulated cotranscription coactivator
APC	adenomatous polyposis coli	DAG	diacylglycerol
APS	ammonium persulfate	Deptor	DEP domain containing MTOR-interacting protein
Bax	p53-Bcl2-associated X protein	DISC1	Disrupted-in-Schizophrenia 1
BCL-2	B cell leukemia/lymphoma 2	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Bcl-X_L	B-cell lymphoma-extra large	DPX	Di-n-butyl phthalate
BDNF	brain derived neurotrophic factor	EAA	essential aminoacids
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death	EAAT4	excitatory amino acid transporter 4
BrdU	Bromodesoxiuridine	ECL	Enhanced chemiluminescence
BSA	bovine serum albumin	EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
C3G	CRK SH3-binding protein	EMT	epithelial mesenchymal transition
CaN	calcineurine	ENaC	epithelial Na ⁺ channels
CBP	CREB binding protein	ERK/ MAPK	Extracellular signal-regulated kinase/ mitogen-activated protein kinase
CDR	cystein domain rich	FasL	Fas Ligand
c-fos	c-FBJ osteosarcoma oncogene	Fgd1	FYVE, RhoGEF and PH-domain containing protein 1
CH1	collagen homology	FKBP12	FK506 binding protein 1a
CHIP	Hsp 70-interacting protein		
CK1α	casein kinase 1 apha		

FKHR forkhead in rhabdomyosarcomas	IP₃ inositol-1,4,5-triphosphate
FoXO3a forkhead box group O transcription factor 3a	IQGAP2 IQ motif containing GTPase activating protein 2
FRE FoxO regulatory elements	IRS-1 insulin receptor substrate 1
GABA γ -aminobutyric-acid	JNK c-Jun N-terminal kinase
Gadd45α DNA damage-inducible protein 45 α	LC3b Map1lc3b
GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	LEF Lymphoid enhancer-binding factor 1
GNDF glial cell line-derived neurotrophic factor	LRR leucine rich region
GDP guanosine diphosphate	LTP long term potentiation
GEF guanine nucleotide exchange factor	MAP microtubule-associated proteins
GLT-1 glutamate transporter-1	Map1lc3b microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
GPCR G protein-coupled receptor	MECP2 methyl-CpG-binding protein 2
Grb2 growth factor receptor-bound protein 2	MEKK map kinase kinase kinase
GRE glucocorticoid regulated elements	MMPs matrix metalloproteinases
GSK3 glycogen synthase kinase 3	MnSOD9 manganese superoxide dismutase
GTP guanosine triphosphate	mTORC1 Mammalian target of Rapamycin Complex 1
H-E hematoxylin-eosyn	mTORC2 Mammalian target of Rapamycin Complex 2
H-motif hydrophobic motif	MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
HPLC High-performance liquid chromatography	NB Neurobasal Medium
HRP Horse raddish peroxidase	N-CAMs neural cell adhesion molecules
HSP90 heat shock protein 90	NDRG1 N-myc downstream regulated gene 1
IκB inhibitor of kappa β	

NF-κB kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	PIKKs phosphoinositide 3-kinase-related kinases
NGF nerve growth factor	PIP2 Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate
NGS normal goat serum	PIP3 Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate
NLS nuclear localization sequence	PKA c-AMP dependent protein kinase 1
NMDA N-methyl-D-aspartate	PKB Protein kinase B
Nogo neurite outgrowth inhibitor	PKC Protein kinase C
NSC neuronal stem cells	PKG c-GMP dependent protein kinase
NT-3 neurotrophin-3	PLC phosphoinositide phospholipase C
NT-4/5 neurotrophin-4/5	PP2A protein phosphatase 2A
p75NTR p75 neurotrophin receptor	PPi prepulse inhibition
PAGE polyacrylamide gel electrophoresis	PRAS40 Proline rich AKT substrate of 40 kD
PBS Phosphate Buffered Saline	PRK PKC-related kinase
PCR Polymerase Chain Reaction	PTB phosphotyrosine binding domain
PDK1 3-phosphoinositide-dependent kinase-1	PtdIns4P Phosphatidylinositol-4-phosphate
PFD paraformaldehyde	PTEN phosphatase and tensin homolog
PGDF platelet-derived growth factor receptor	PX domain phox domain
PH-domain Pleckstrin homology domain	Rap ras related protein
PHLPP PH-domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase	Ras rat sarcoma
PI3K phosphoinositide 3-kinase	Rb1cc1 RB1-inducible coiled-coil 1
PIC preinitiation complex	RBD Ras binding domains
PIF-pocket PDK1 interacting fragment pocket	RNPs ribonucleoproteins

ROI region of interest	TCF T-cell factor
ROS reactive oxygen species	TE Tris-EDTA
RSK p90 ribosomal S6 kinase	TEMED N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
RUNX3 Runt domain containing transcription factor	TGFβ transforming growth factor beta
Ryr ryanodine receptor	TGN Trans-Golgi Network
S6 Ribosomal protein S6	TNF tumour necrosis factor
S6K p70 ribosomal S6 kinase	TNFR-SF tumour necrosis factor receptor superfamily
SDS sodium dodecyl sulphate	TRAIL tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand
SGK Serum and glucocorticoid-inducible kinase	TrkB Tropomyosin-receptor-kinase B
SH2 src homology 2	Tti1 TELO2 interacting protein 1
Shc collagen-homologous region	ULK unc-51 like autophagy activating kinase 1
SHIP SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase	VGCCs voltage-gated Ca ²⁺ channels
SIRT1 sirtuin1	WB Western blott
SIRT2 sirtuin2	Wnt wingless-type MMTV integration site family
SLC1A5 solute carrier family 1	
SMAD3 SMAD family member	
SNC sistema nerviós central	
Sod2 superoxide dismutase 2	
SOS son of sevenless	
SSRI selective serotonin reuptake inhibitor	
TBS Tris buffered saline	
TBS-T Tris Buffered Saline Tween-20	

RESUM

La via de la PI3K/PKB juga un paper molt important en el sistema nerviós central durant el desenvolupament neuronal. PDK1 és la màster quinasa que s'encarrega de coordinar les diverses senyals de la PI3K, regulant diferencialment l'activació de diferents AGC quinases. A fi d'estudiar el paper de PDK1 al sistema nerviós central, vàrem generar dos models de ratolí que presentaven mutats dos dominis funcionals d'aquesta quinasa: el PH-domain i el PIF-pocket.

En aquesta tesi es desenvolupa la caracterització del model de ratolí knock-in condicional que expressa la mutació L155E de PDK1 a sistema nerviós central. Aquesta mutació resulta en la inhabilitació del domini PIF-pocket de PDK1 i per tant en una disrupció del mecanisme d'activació de totes les AGC quinases que no presenten PH-domain, com són RSK, SGK i S6K, però no PKB. La manca d'activació d'aquestes quinases no resulta essencial per les respostes de supervivència i viabilitat cel·lular, però sí que impedeix el correcte desenvolupament neuronal, el que es tradueix en un dèficit de la polarització i diferenciació neuronal. Els defectes en aquests processos neuronals resulten en una reducció de la mida cerebral i en alteracions fisiològiques de regions del cervell com el còrtex o l'hipocamp. Aquestes alteracions impliquen una reducció en la connectivitat neuronal i en la comunicació entre interneurons gabaèrgiques i neurones piramidals, possiblement causada per dèficits en els processos de migració durant el desenvolupament. Tot això condueix a un model de ratolí que presenta alterada la seva conducta davant l'estrès i emula els símptomes negatius i cognitius de trastorns psiquiàtrics com l'esquizofrènia. Aquests resultats mostren la rellevància de PDK1, orquestrant la via de la PI3K, tant durant el desenvolupament neuronal com en la consolidació del correcte funcionament del cervell.

INTRODUCCIÓ

1. Senyalització en el sistema nerviós central

1.1 Neurotrofines i els seus receptors neuronals

Les neurotrofines es van descobrir per primera vegada, al voltant dels anys 50, com una fracció abundant de proteïna present en les glàndules submandibulars de ratolí anomenada nerve growth factor (NGF) ja que era indispensable pel desenvolupament i creixement del gangli simpàtic (Levi-montalcini and Booker, 1960). En mamífers, s'expressen 4 tipus diferents de neurotrofines: l'NGF, el brain derived neurotrophic factor (BDNF), la neurotrophin-3 (NT-3) i la neurotrophin-4/5 (NT-4/5). També hi ha dues neurotrofines més però que només s'expressen en peixos teleostis, la NT-6 i la NT-7 (Gotz et al., 1994; Lai et al., 1998). D'altra banda, una segona família de factors neurotròfics que es troba encapçalada pel glial derived neurotrophic factor (GDNF) està implicada en el mateix tipus de respostes que les neurotrofines (Lin et al., 1993) actuant a través de vies de senyalització similars (Soler et al., 1999).

Les neurotrofines són sintetitzades en el reticle endoplasmàtic rugós tan de cèl·lules no neuronals com de neurones, on són modificades postraduccionalment i conseqüentment emmagatzemades en vesícules secretòries. Les pro-neurotrofines són primer proteolitzades en el Trans-Golgi Network (TGN) per proteases de la família de les pro-proteïna convertases i, un cop secretades, el seu processament el realitza la serina proteasa plasmina o matrix metalloproteinases (MMPs) selectives com les MMP-3 i MMP-7 (Lee et al., 2001). Un cop han estat modificades postraduccionalment, les neurotrofines s'associen no-covalentment formant homodímers *in vivo* i, en alguns casos, heterodímers *in vitro* (Heymach and Shooter, 1995; Gary and Barde, 1996). En neurones, l'NGF, la NT-3 i la NT-4 s'alliberen de forma constitutiva per mantenir activades les vies implicades en respostes de supervivència cel·lular; mentre que l'alliberació del BDNF, que s'acumula en vesícules somatodendrítiques, ve regulada per l'activitat elèctrica neuronal i per tant influeix d'una forma plàstica en les estructures que formen la xarxa elèctrica neuronal (Goodman et al., 1996; Farhadi et al., 2000).

L'NGF va ser la primera neurotrofina que es va definir com un factor tròfic que s'expressava en les cèl·lules perifèriques tan no-neuronals com en neurones sensorials i motores. L'NGF s'internalitza juntament amb el seu receptor i es transporta en vesícules, a través de l'axó, fins al soma neuronal (Thoenen and Barde, 1980). La desconnexió d'aquesta comunicació comportava la mort de les cèl·lules nervioses en diferenciació i una reducció de la mida d'aquestes; per tant, es va poder associar per primera vegada les neurotrofines amb una resposta de supervivència i viabilitat cel·lular (Levi-montalcini, 1987).

Més tard, es va descobrir que aquestes proteïnes dimèriques també jugaven un paper important en el sistema nerviós central en la formació de les sinapsis i en la connectivitat neuronal tan durant el desenvolupament embrionari com en el cervell adult (Gary and Barde, 1996).

Seguint la línia d'experiments de *Levi-Montalcini i Booker* es va descobrir la segona neurotrofina, el BDNF (Brain derived neurotrophic factor), a l'observar que en els extractes de cervell de porc hi havia quelcom que induïa el creixement de les fibres nervioses d'extractes fetals de retina de rata en cultiu i que no es reproduïa en tractar amb NGF (Turner et al., 1982). Com a conseqüència, a aquesta segona neurotrofina se li va atribuir una funció a nivell de sistema nerviós central mentre que l'NGF mantenia la seva influència, principalment, en el sistema nerviós perifèric.

La regulació transcripcional del BDNF pot dependre d'un estímul visual, d'un xoc osmòtic a la zona ventricular, o de l'activitat neuronal. La regulació a la baixa d'aquesta neurotrofina per activitat sinàptica és mediada pels receptors γ -aminobutyric-acid (GABA), i a l'alça a través dels receptors N-methyl-D-aspartate (NMDA) (Thoenen, 1995). La despolarització en la membrana presinàptica neuronal comporta un entrada de Ca^{2+} a través dels voltatge-gated Ca^{2+} channels (VGCCs) i els receptors de NMDA. El Ca^{2+} activarà la βCAMKII i la calcineurina (CaN), i això permet l'activació de la γCAMKII , ja que requereix de la fosforilació per la βCAMKII i la defosforilació per part de la fosfatasa calcineurina. Un cop activada, la γCAMKII promou la translocació del complex $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ al nucli, on activa la CAMKK i el seu substrat la CAMKIV, que alhora activa al factor de transcripció cAMP-response element binding protein (CREB)

i a un dels seus coactivadors, el CREB binding protein (CBP) (Ma et al., 2014). De forma simultània, la CaN allibera a l'altre coactivador de CREB, CREB-regulated cotranscription coactivator (CRTC) de la repressió per part de la proteïna 14-3-3, permetent a CRTC translocar a nucli per unir-se a CREB (Saura and Valero, 2011). CREB s'uneix a seqüències altament conservades anomenades seqüències CRE i que són molt abundants en els promotors ubicats per damunt de la regió 5' untranslated region (5'UTR) del gen que codifica pel BDNF, induint així la seva transcripció. D'altra banda, perquè es doni aquest procés es requereix que la CaMKII, translocada a nucli com a conseqüència de l'estímul de Ca^{2+} , fosforili i desplaci a la methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2), que en complex amb altres proteïnes actuen com a repressors d'aquestes regions reguladores del gen del BDNF (Fig.1).

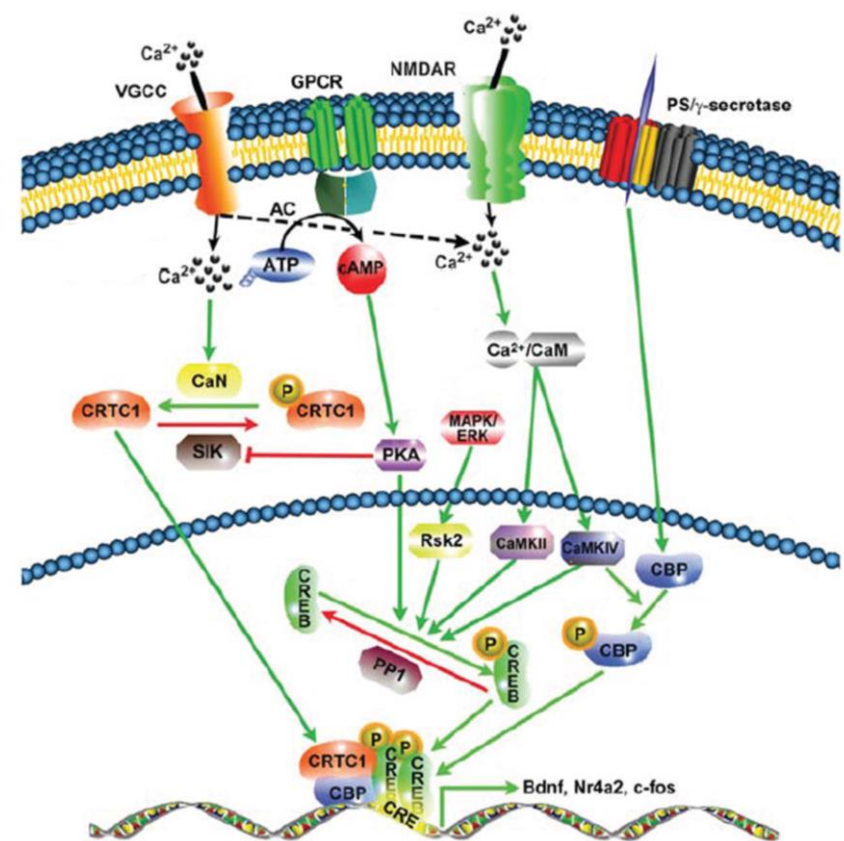


Figura 1. Vies de senyalització que regulen els factors de transcripció dependents de CREB a neurones. Esquema on es representa la comunicació entre la membrana, el citoplasma i el nucli, en resposta a múltiples estímuls extracel·lulars, que requereix la coordinació de diverses vies de senyalització. La imatge ha estat extreta i modificada de l'article (Saura and Valero, 2011).

Es generen diferents transcrits de BDNF amb diferents llargades dels extrems 5' i 3' UTR, on els que presenten els segments 3' UTR més llargs es transporten a les dendrites (Park and Poo, 2013). Aquests transcrits es troben units a ribonucleoproteïnes (RNPs) que protegeixen els grànuls d'ARN de la traducció fins que no arriben a la seva destinació, alhora que interaccionen amb proteïnes motores com són les kinesines i dineïnes, que faran ús dels microtúbuls per portar la càrrega a nivell presinàptic (Fig.2). Un cop allà, aquests transcrits seran traduïts per tota la maquinària de síntesi proteica activada a través de les vies de la mitogen-activated protein kinases (MAPK) i la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) (Hirokawa et al., 2010; Raju et al., 2011).

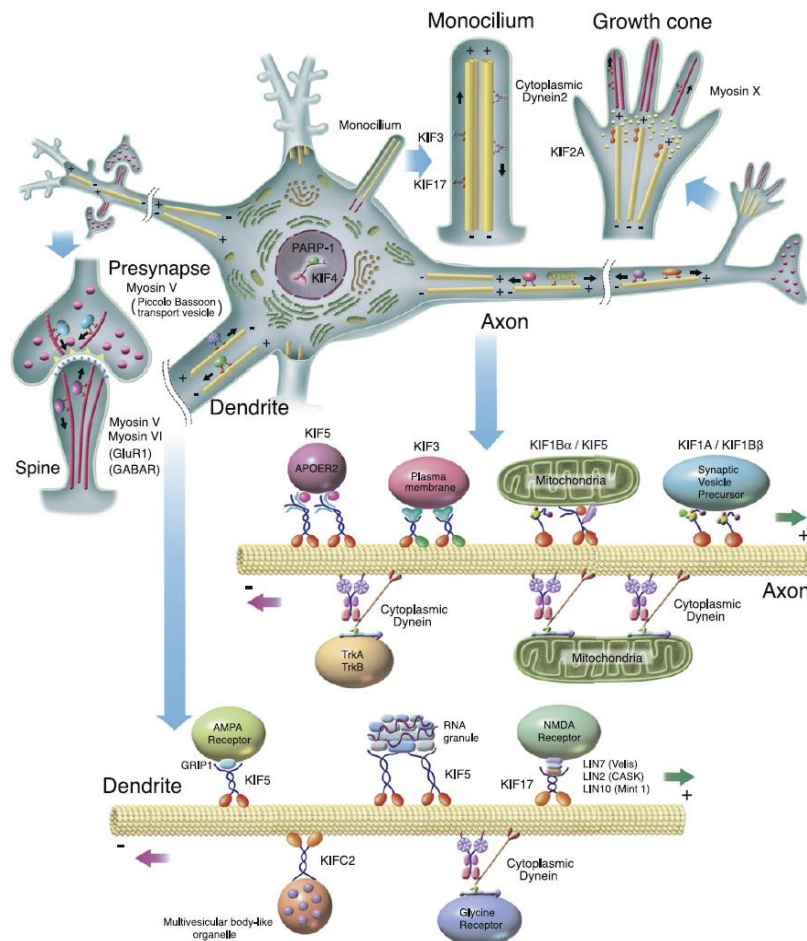


Figura 2. Transport intracel·lular en neurones. Representació del transport retrògrad i anterògrad d'òrgànuls i vesícules amb contingut de diferent índole, a través de les diferents proteïnes associades als microtúbuls al llarg de la dendrita i l'axó neuronal. Imatge extreta de (Hirokawa et al., 2010).

Les pro-neurotrofines són, com hem vist anteriorment, processades i emmagatzemades en vesícules presinàptiques per ser posteriorment alliberades (Fig.3). En el cas del BDNF, aquest procés és dependent de la despolarització neuronal mitjançada pel Ca^{2+} (Goodman et al., 1996).

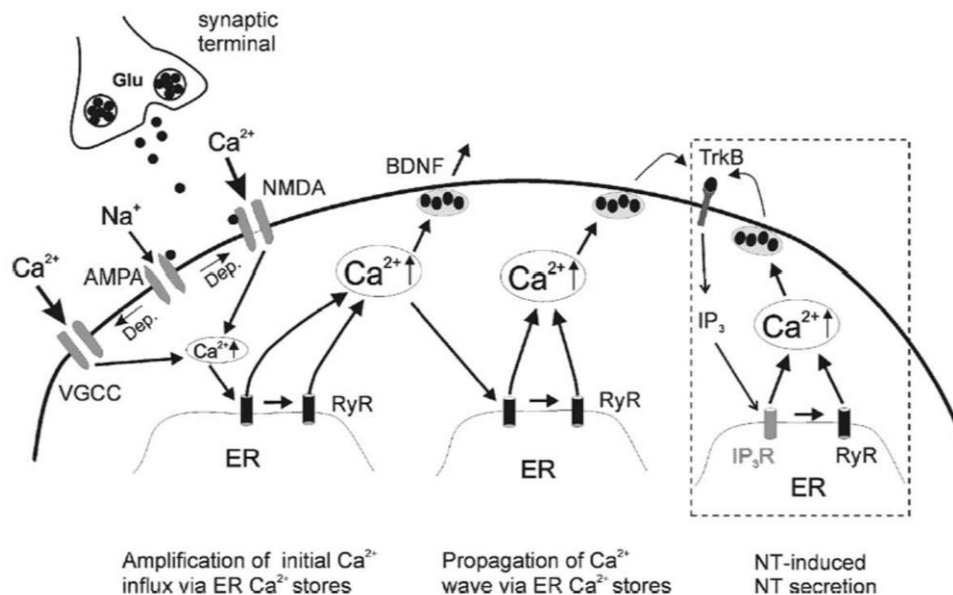


Figura 3. El paper de les diferents fonts de Ca^{2+} neuronals en l'alliberació del BDNF. La primera entrada de Ca^{2+} a través de l'estimulació dels receptors d'AMPA, NMDA i VGCC, genera una senyal intracel·lular que és amplificada i sostinguda amb l'alliberació del Ca^{2+} del reticle endoplasmàtic (ER) gràcies als receptors de RyR i IP₃. Imatge obtinguda de (Lessmann et al., 2003).

Les diferents neurotrofines poden activar dos tipus de receptors, els receptor tropomyosin-related kinase (Trk) i els p75 neurotrophin receptor (p75NTR). Cada neurotrofina té afinitat per un receptor Trk específic però amb menor afinitat de nivell nanomolar, totes poden també unir-se al p75NTR. Aquest receptor juntament amb la proteïna sortilina uneixen directament a les pro-neurotrofines amb una major afinitat que amb les neurotrofines, tot desencadenant respostes cel·lulars apoptòtiques. D'altra banda, si les pro-neurotrofines s'uneixen a p75NTR acompanyat al receptor neurite outgrowth inhibitor (Nogo) es dona una inhibició axonal (Reichardt, 2006).

La inespecificitat del p75NTR pel lligand és deguda a què el receptor estableix una unió asimètrica entre dues regions separades espacialment de l'homodímer i els 4 dominis rics en cisteïnes del receptor (CRD 1, 2, 3, 4). Això

provoca un canvi conformacional en la neurotrofina impedit així la formació de dímers de p75NTR i habilitant la interacció amb algun altre receptor Trk que pot reconèixer específicament una neurotrofina diferent (Fig.4). Aquestes regions són molt característiques de la superfamília tumour necrosis factor receptor superfamily (TNFR-SF) però a diferència de la resta de membres d'aquesta família que uneixen a lligands trimèrics com el tumour necròtic factor (TNF), el p75NTR té afinitat per lligands dimèrics com les neurotrofines (He and Garcia, 2004).

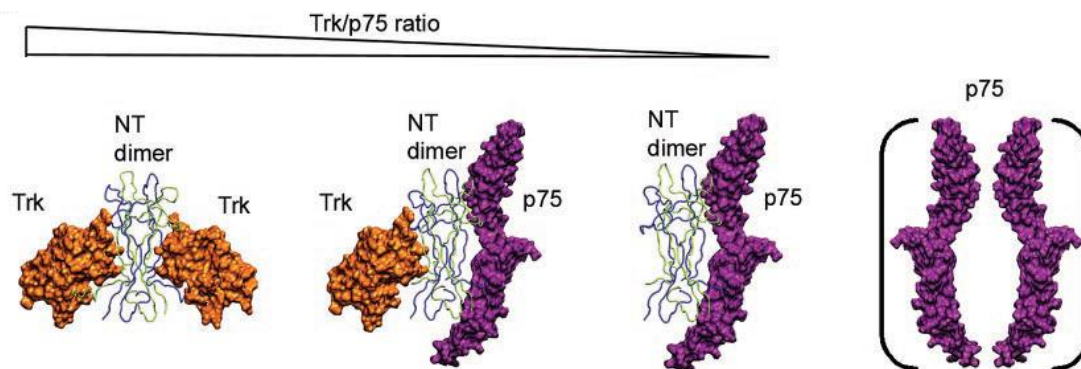


Figura 4. Diagrama de l'equilibri, en la superfície cel·lular, entre els diversos complexes formats per les neurotrofines i els receptors p75 i Trk. En diagrames d'estructures tridimensionals es representa, de major a menor grau, la *ratio* TrkA/p75. La proporció de cada receptor que forma el complex és la següent: 2:2 NGF/TrkA, 1:2:1 TrkA/NGF/p75, 2:1 NGF/p75 i finalment el dímer p75 en absència de lligand. La figura ha estat obtinguda i adaptada de (He and Garcia, 2004).

Els receptors Trk són el segon grup de receptors que poden reconèixer les neurotrofines. Malgrat haver-hi tantes isoformes, tots els receptors Trk són proteïnes transmembrana d'uns 140 kDa que presenten un domini extracel·lular a l'extrem N-terminal i un domini intracel·lular catalític de tipus tirosina quinasa a l'extrem C-terminal. El domini extracel·lular està format per 3 dominis en tàndem que inclouen repeticions de 24 leucines (leucine rich region (LRR) 1-3) i que es troben entre dos clústers rics en cisteïnes (C1 i C2) homòlegs a les regions del p75NTR. A continuació d'aquesta regió hi ha dos dominis immunoglobulina (Ig1 i Ig2) que també són presents en altres molècules neuronals com són les neural cell adhesion molècules (N-CAMs) o els platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) i per tant, com aquestes proteïnes, també tindrien un paper en l'adhesió neuronal durant el desenvolupament

(Schneider and Schweiger, 1991). A diferència dels p75^{NTR}, els receptors Trk presenten un domini catalític intracel·lular que resulta fosforilat en alguns dels 10 residus de tirosina conservats evolutivament d'aquesta regió i que són indispensables per a l'activació del receptor (Fig.5A) (Huang and Reichardt, 2003). En el cas del receptor TrkA, les tirosines fosforilades són la 499, la 643, la 704, la 760 i la 794, on les 3 primeres permeten l'activació del receptor per auto-transfosforilació d'aquests residus i estabilització del receptor dimèric TrkA (Fig.5B), mentre que les darreres permetran la transmissió del senyal, mitjançant el reclutament de diferents proteïnes adaptadores, a través de les corresponents vies de senyalització per acabar desencadenant respostes cel·lulars com el creixement neurític (Inagaki et al., 1995).

Tots els gens Trk codifiquen per diferents transcrits generant una immensa varietat funcional de receptors. Així, el proto-oncogen TrkA codifica per dues isoformes proteïques que difereixen en la presència de 6 aminoàcids propers a la regió transmembrana. Tot i que han estat relacionades amb les mateixes funcions biològiques, s'ha vist que les isoformes del receptor més llargues s'expressen en cèl·lules neuronals mentre que les que són més curtes ho fan en cèl·lules no-neuronals. El receptor de TrkB conserva un 88% d'homologia amb la resta dels receptors en el domini catalític tot i que, a diferència de TrkA, les diverses isoformes generades difereixen en la llargada d'aquest domini catalític, amb dues variants inactives que es caracteritzen per tenir un domini intracel·lular truncat amb absència del domini tirosina quinasa. Respecte a l'últim receptor de neurotrofines TrkC, podem trobar fins a 4 isoformes; 3 de les quals es caracteritzen per tenir elongacions aminoacídiques juxtaposades als residus de tirosina transfosforilables, mentre que la última isoforma del receptor TrkC tampoc no presenta domini catalític al igual que algunes isoformes del receptor TrkB (Barbacid, 1994). Aquests receptors orfes de domini catalític estarien implicats en la formació i consolidació de la sinapsi, ja que la seva expressió augmenta en la segona i tercera setmana postnatal, de forma correlacionada amb el procés de la sinaptogènesi que es dona al cervell. Un clar exemple és la implicació de les isoformes del receptor de TrkC truncades en la diferenciació de la neurona excitatòria actuant com a molècules d'adhesió (Takahashi et al., 2011).

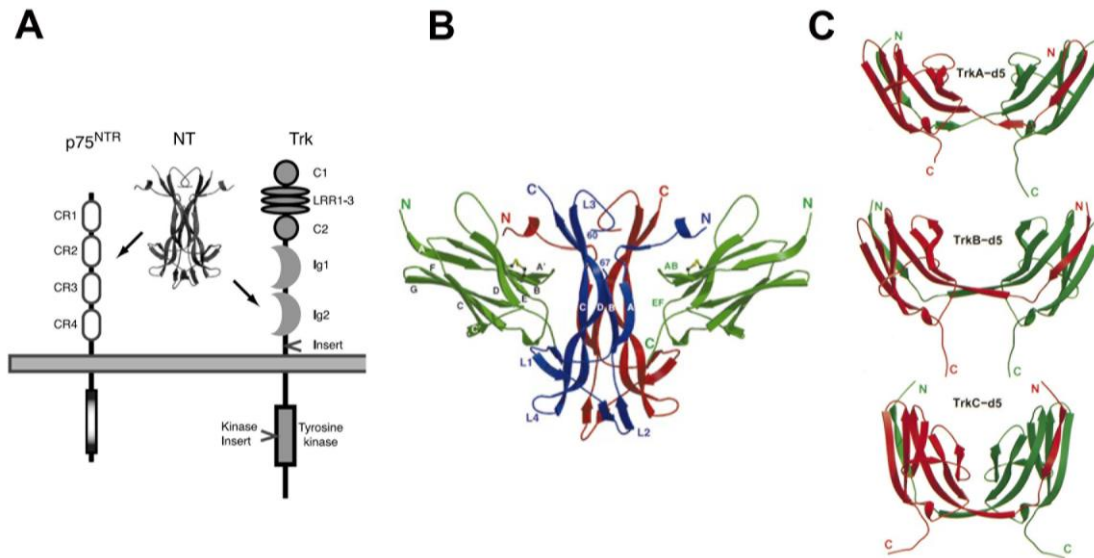


Figura 5. Caracterització estructural dels receptors Trk i p75 i dels seus dominis d'unió a neurotrofina. (A) Diagrama on es mostren els diferents dominis dels receptors p75 i Trk, i s'indiquen els dominis amb els quals interacciona la neurotrofina a cada receptor. (B) Representació estructural del complex TrkA-NGF. Els monòmers d'NGF es representen amb els colors vermell i blau; mentre que el domini extracel·lular 5 (d5) del receptor TrkA, corresponent a Ig2, amb color verd. Les diferents lletres indiquen els extrems del domini, els *loops* més rellevants i alguns elements que conformen l'estructura secundària del complex. (C) Resolució cristal·logràfica del domini extracel·lular d5 d'unió a neurotrofina Ig2 dels diferents receptors Trk. S'observen en vermell i en verd cadascun dels monòmers que conformen els dímers dels diferents receptors. Imatges obtingudes i modificades de (Ultsch et al., 1999; Wiesmann et al., 1999; Huang and Reichardt, 2003).

Les diferents regions extracel·lulars del receptor Trk poden participar en la interacció amb el lligand, però la regió més important i que li dona especificitat d'unió per una neurotrofina i no per una altra és el domini 5 extracel·lular (Ig2). La zona de reconeixement entre el receptor i el lligand implica dues regions: l'extrem C-terminal del domini Ig2 del receptor, que interacciona amb el full beta del nucli de l'homodímer del lligand i el qual es troba altament conservat en les diferents neurotrofines; l'altre regió comprèn el full 'ABED' del domini Ig2 del receptor, que difereix estructuralment en els diferents Trk i dona especificitat per un lligand o un altre tot interaccionant amb les regions de l'extrem N-terminal de l'homodímer, que també varien en les diverses neurotrofines. (Ultsch et al., 1999; Wiesmann et al., 1999).

Basant-nos en aquesta unió lligand-receptor trobem que l'NGF transmet la senyal a través de receptors TrkA; el BDNF i la NT-4, a través dels receptors TrkB i la NT-3 a través dels receptors TrkC (Fig.6). Aquestes interaccions són altament específiques, tot i que la NT-3 pot induir una activació, en menor intensitat, dels receptors de TrkB i TrkA (Barbacid, 1994). A més a més, la presència del p75NTR regularia a la baixa l'eficiència d'activació del receptor TrkA per part de la NT-3 i del receptor TrkB per part de les NT-3 i NT-4, prioritzant l'especificitat d'aquests receptors per les seves respectives i principals neurotrofines: l'NGF i el BDNF (Huang and Reichardt, 2003).

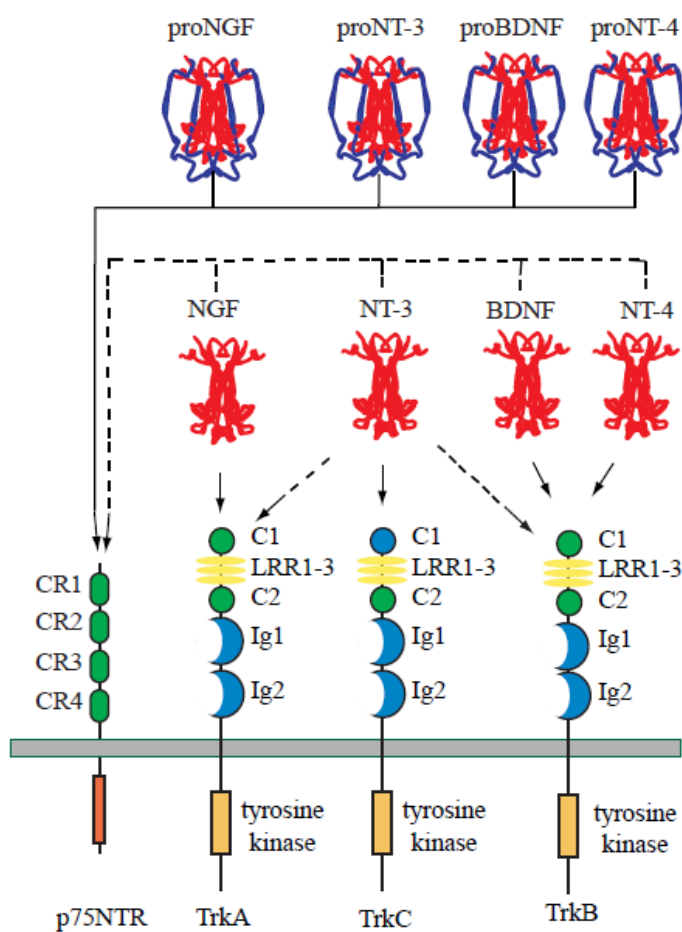


Figura 6. Interacció receptor-neurotrofina. Representació de l'especificitat d'unió de les pro-neurotrofines, de forma exclusiva, als receptors p75, i els diferents graus d'afinitat de les diferents neurotrofines amb els seus corresponents receptors Trk. Imatge obtinguda de (Huang and Reichardt, 2003).

Les respostes de supervivència i apoptosi neuronals requereixen d'una complexa intercomunicació entre els diferents lligands (neurotrofines i proneurotrofines) i els respectius receptors (p75NTR i els Trk). Els receptors Trk activats per les diferents neurotrofines senyalitzen la supervivència cel·lular suprimint les proteïnes apoptòtiques a través de la via PI3K/PKB, activant les proteïnes antiapoptòtiques a través de la via de les MAPK, alhora que inactiven

la via c-Jun N-terminal kinases (JNK)-p53-Bcl2-associated X protein (Bax), interferint així en la apoptosi induïda pel receptor p75NTR (Kaplan and Miller, 2000). Si p75NTR s'uneix a neurotrofines, pot arribar a potenciar l'activitat del receptor de Trk, bé sigui indirectament a través de l'alliberació de la proteïna nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) del seu repressor, l'inhibitor of kappa β (Ik β), tot induint així respostes de supervivència cel·lular; o bé mitjançant l'activació de l'esfingomielinasa àcida que hidrolitza l'esfingomielina i genera ceramides. Aquests fragments lipídics estan implicats també en l'activació de l'NF- κ B, la proteïna JNK i el receptor TrkA, que al seu torn regula la supervivència neuronal selectivament a través de la via de la PI3K, però no de la d'ERK i que es troba també involucrat en l'alliberament de neurotransmissors (Song and Posse De Chaves, 2003; Reichardt, 2006). Contràriament, els p75NTR sols o units a pro-neurotrofines indueixen la apoptosi cel·lular a través de la via JNK-p53-Bax, o bé reduint l'afinitat dels receptors Trk pels seus lligands i per tant disminuint la resposta de supervivència cel·lular (Kaplan and Miller, 2000). Per tant, podem veure que existeix una regulació molt fina de les vies i les conseqüents respostes cel·lulars associades a la unió de les neurotrofines als seus receptors, i per tant encara queda molt per descobrir sobre el funcionament d'aquest mecanisme.

Al llarg de les diferents etapes embrionàries, el receptor TrkB s'expressa en diferents regions tant a nivell del sistema nerviós central com en el perifèric; però a diferència dels altres receptors Trk, aquest no s'expressa en regions associades a proliferació com ara la cresta neural, on es donen fenòmens de mitogènesi previs als processos de migració (Klein et al., 1990). D'acord amb aquest fet i que, com hem vist anteriorment, la seva principal neurotrofina està implicada en processos de desenvolupament, això ens ajuda a entreveure la importància d'aquests dos *partners* en les etapes primerenques de desenvolupament neuronal i en la consolidació de la memòria en el cervell adult a través del manteniment de les xarxes neuronals.

1.2 Vies de senyalització activables per neurotrofines

TrkB i la resta de receptors Trk estimulen diferents respostes cel·lulars a través de 3 vies clàssiques de senyalització: la via de la fosfoinosítide

phospholipase C (PLC- γ 1), la via de la rat sarcoma (Ras)-MAPK i la via de la PI3K.

Les diferents vies tenen en comú el mecanisme de *switch on* pel qual les neurotrofines provoquen la dimerització dels receptors Trk, els quals es transfosforilen en residus de tirosina presents en el domini catalític intracel·lular i que, com hem vist abans, es troben conservats evolutivament.

1.2.1 Via de la PLC- γ 1

El domini SH2 de la PLC- γ 1 reconeix la Tyr (Tyrosine) 816 fosforilada del domini intracel·lular del receptor Trk; aquesta interacció comporta un canvi conformacional que permet l'activació de la quinasa (Gresset et al., 2010). Un cop activada, PLC- γ 1 hidrolitza el lípid de membrana phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) generant dos fragments que actuaran com a segons missatgers: el cap hidrofòbic diacylglycerol (DAG) i la cua hidrofílica inositol-(1,4,5)-trisphosphate (IP₃). Per una banda, l'IP₃ interaccionarà amb els receptors d'IP₃ que permeten l'alliberació del Ca²⁺ intracel·lular i que es veurà sostinguda en el temps per l'activació dels receptors de ryanodine (Ryr) del reticle endoplasmàtic, resultant en l'activació de la CaM i la seva via de senyalització (McPherson et al., 1991). D'altra banda, el DAG promou la translocació de la protein kinase C (PKC) a la membrana a través de la interacció amb el seu domini C1, on és fosforilada per PDK1; mentre que la interacció del calci amb el domini C2 li provocarà un canvi conformacional que l'alliberarà del seu pseudosubstrat promovent la seva activació i induïnt les corresponents respostes de migració, diferenciació, proliferació i apoptosi, entre d'altres associades a aquesta quinasa (Fig.7) (Huang and Reichardt, 2003; Wang, 2006).

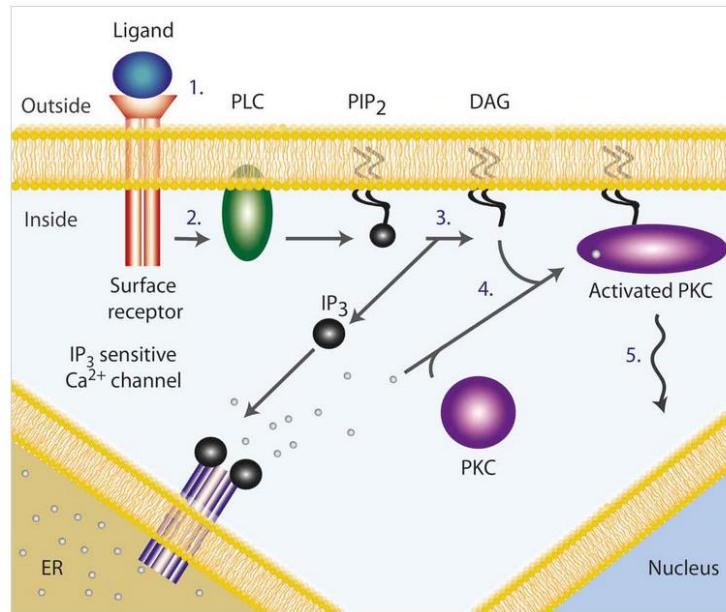


Figura 7. Via d'activació de les PKC convencionals. Esquema representatiu de la via de la PLC amb l'activació final de la PKC, on els nombres indiquen l'ordre seqüencial dels fets que ocorren en aquesta via de senyalització i que es descriuen en el text. Imatge obtinguda de la informació descriptiva de la línia d'investigació del grup del Dr. Michael Leitges del Biotechnology Centre of Oslo, Blindern, Oslo, Norway.

1.2.2 Via de la Ras-MAPK

El receptor Trk activat és reconegut en el seu domini intracel·lular per la proteïna SH2 domain and collagen-homologous region (Shc) que forma part d'una gran família de proteïnes anomenades adaptadores i la funció de les quals és transmetre el senyal extracel·lular a la via de senyalització corresponent. Aquesta proteïna té tres dominis: el domini phosphotyrosine binding domain (PTB), que interacciona i reconeix la Tyr 512 del receptor TrkB, el domini src homology 2 (SH2), que és característic en aquesta família de proteïnes adaptadores i reconeix també les Tyr fosforilades del receptor, i el domini central collagen homology (CH1) que és fosforilat per Trk a la Tyr 317, creant així un *docking site* per la proteïna adaptadora Grb2 en complex amb la proteïna son of sevenless (SOS), que transloquen a la membrana en presència de l'estímul (Sasaoka and Kobayashi, 2000). La proteïna SOS és una guanine nucleotide exchange factor (GEF) i catalitza l'intercanvi de guanosine diphosphate (GDP) a guanosine trisphosphate (GTP) en la proteïna rat sarcoma (Ras) promovent així la seva activació (Chardin et al., 1993; Nimnual

et al., 1998). Hi ha diferents isoformes de Ras i les diferències funcionals entre elles poden ser degudes a la seva localització (Fig.8B). L'H-Ras es troba en zones lipídiques de la membrana molt estructurades com són els lípids raft; K-Ras, es troba en zones lipídiques més desorganitzades, mentre la ras related protein (Rap) es troba en vesícules endosomals. Les diferents variants de Ras activen la map kinase kinase kinase (MEKK) B-Raf, isoforma més activa al sistema nerviós central sota l'estímul de l'NGF, i la senyal d'aquesta és sostinguda en el temps per la proteïna Rap1, que es troba regulada per la via de la PI3K alhora que és activada per la proteïna adaptadora CT10 Regulator of Kinase (CRK) i la GEF, CRK SH3-binding protein (C3G) (York et al., 1998). B-Raf activa per fosforilació MEK1/2 i la seva corresponent MAPK, ERK1/2. Cada MEKK activa una MAPK diferent, les que es troben principalment implicades en respostes d'apoptosi i supervivència són la ERK1/2, la JNK1-3, la p38 i la ERK5 (Fig.8A) (Robinson and Cobb, 1997; Pearson et al., 2001).

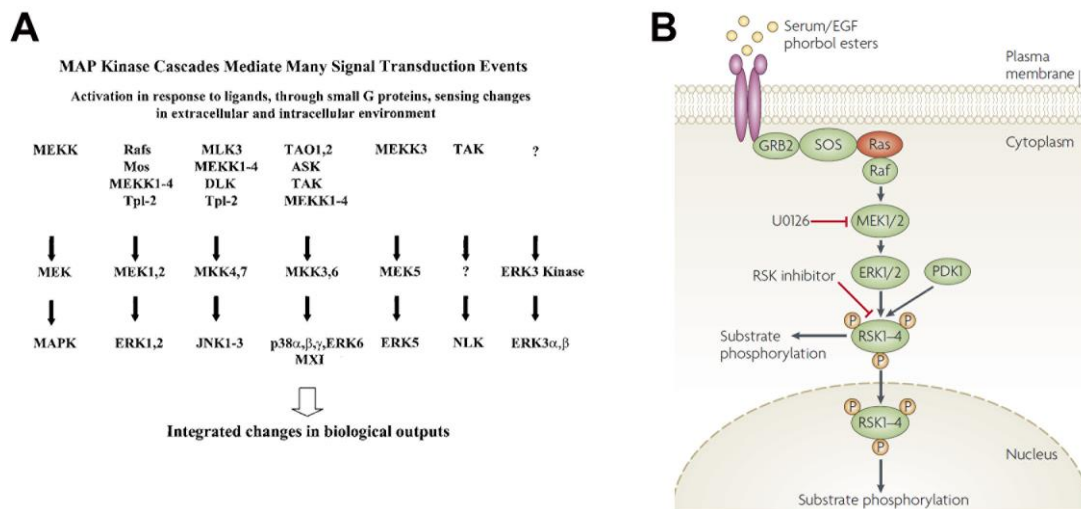


Figura 8. Via de senyalització de la Ras-MAPK. (A) Esquema de les diferents vies de senyalització que porten a l'activació de les MEK i conseqüentment de les MAPK. (B) Representació de la via canònica de la MAPK que acaba comportant la fosforilació de RSK per part d'ERK 1/2 i de PDK1. Imatges obtingudes de (Pearson et al., 2001; Anjum and Blenis, 2008).

Les quinases ERK1/2 es troben prop dels receptors i transportadors de la membrana plasmàtica pròximes a regions de lípids rafts, en la membrana plasmàtica dels endosomes i properes a microtúbuls. El tràfic a nucli de la

ERK1/2 inactiva es dona a través de la interacció amb les nucleoporines en processos independents d'energia, mentre que un cop activada entra a nucli, a través de processos dependents d'energia per activar factors de transcripció (Ranganathan et al., 2006; Raman et al., 2007).

1.2.3 Via de la PI3K

Les PI3Ks són una família de lípid quinases que addicionen un grup fosfat en el grup hidroxil de la posició D3 de l'anell inositol dels fosfolípids PtdIns, PtdIns-4-phosphate (PtdIns4P) i del PtdIns-(4,5)-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) (Fig.9). D'aquestes reaccions enzimàtiques en resultaran els lípids PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂ i PtdIns(3,4,5)P₃ respectivament; aquests fosfoinositols són accessibles a fosfatases que revertiran el procés enzimàtic eliminant un grup fosfat.

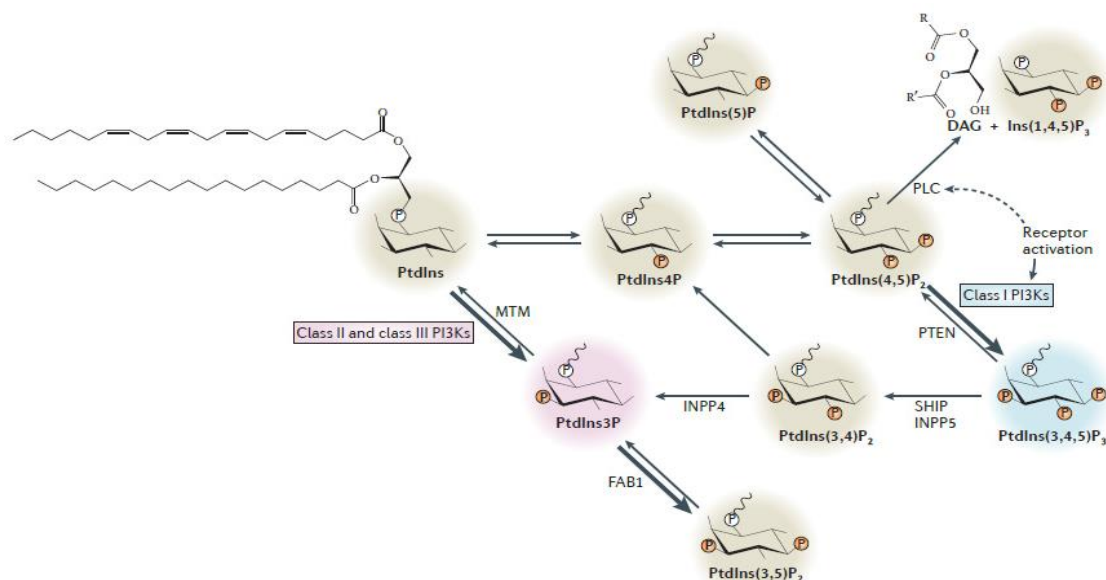


Figura 9. Reaccions catalitzades per les PI3Ks. Imatge obtinguda de (Vanhaesebroeck et al., 2012).

Hi han 3 classes diferents de PI3Ks en funció de la seva estructura i l'especificitat pel seu substrat lipídic: les PI3K de classe I consten d'una subunitat reguladora que conté dominis SH2 que li permetran interaccionar amb els receptors de membrana activats o amb les seves proteïnes adaptadores, i una subunitat catalítica amb activitat lipíd quinasa; les PI3K de classe II conformades per les variants PI3K-C2α, PI3K-C2β i PI3K-C2γ; i la PI3K de classe III representada únicament per la PIK3C3 o Vps34. Dins les

PI3K de classe I trobem les de classe IA conformades per les subunitats catalítiques p110 α , p110 β , p110 γ que interaccionen amb les subunitats reguladores p85 α , p85 β , p55 α , p50 α i p55 γ , mentre que la p110 γ només pot interaccionar amb la subunitat p87, formant el grup de les PI3K de classe IB (Vanhaesebroeck et al., 1997, 2010).

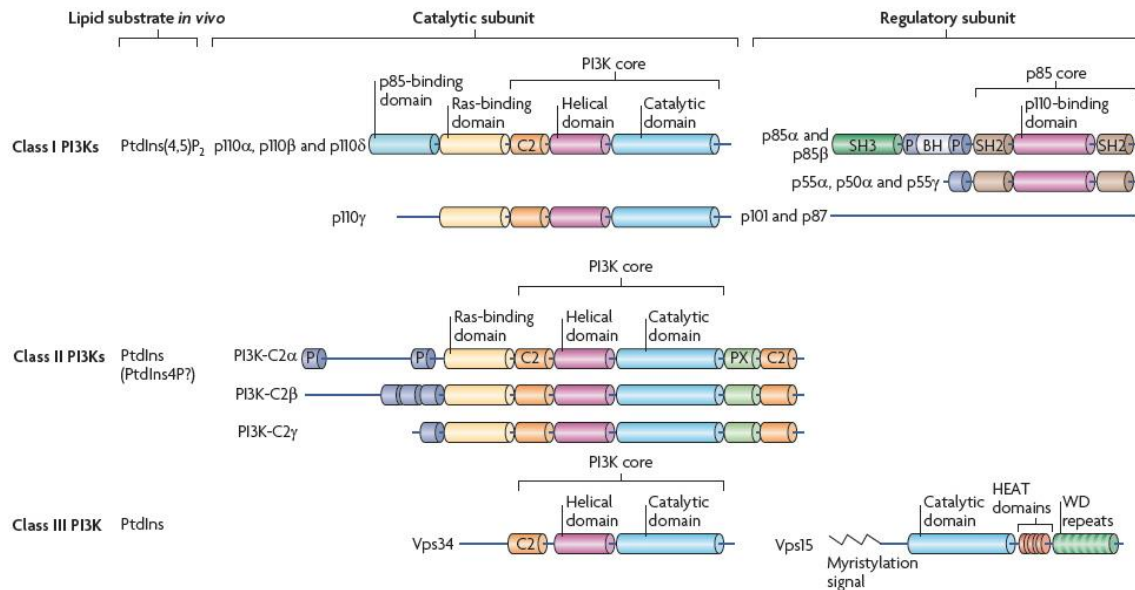


Figura 10. Classificació i estructura dels dominis de les PI3Ks. Les PI3K es poden dividir en 3 classes en funció de la seva estructura i les característiques o funcions bioquímiques. En la imatge es classifiquen les diferents PI3K de classe I, II i III en funció dels lípids amb els que interaccionen i si la seva estructura la defineix com una subunitat catalítica o reguladora. Totes les subunitats catalítiques de la PI3K, com a mínim, contenen un domini C2, un domini helicoidal i un domini catalític.

Les PI3K de classe I poden interaccionar i ser activades a través de receptors Trk, receptors G-protein cupled receptors (GPCR) i proteïnes G (G β γ) acoblades a aquests receptors, així com mitjançant la proteïna Ras, ja que totes les subunitats p110 de les PI3K de classe I presenten Ras binding domains (RBD). Aquest tipus de PI3K són les úniques capaces de generar PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃) a partir de PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂), que pot ser defosforilat per la fosfatasa phosphatase and tensin homologue (PTEN) generant PtdIns(4,5)P₂, per SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase (SHIP) generant PtdIns(3,4)P₂ o per la INPP4A/4B generant PtdIns-3-P. El PIP₃ és un potent segon missatger que indueix la translocació de diferents proteïnes efectores a

la membrana plasmàtica. Aquestes inclouen Serine/Treonine, Tyrosine proteïnes quinasa, proteïnes adaptadores i GTPases que comparteixen homologia en un domini anomenat pleckstrin homology (PH-domain) present per exemple a la phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) o la proteïna kinase B (PKB). Aquest domini reconeix els fosfoinosítids de membrana que presenten grups fosfat en posicions adjacents de l'anell inositol, a diferència d'altres dominis que reconeixen els productes lipídics sense grups fosfats pròxims com pot ser el cas del domini phox (PX) present en la serum and glucocorticoid inducible kinase 3 (SGK3) o el zing-finger-like (FYVE) present a la proteïna Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor (Rho/Rac GEF) FGD1 (Fig.11).

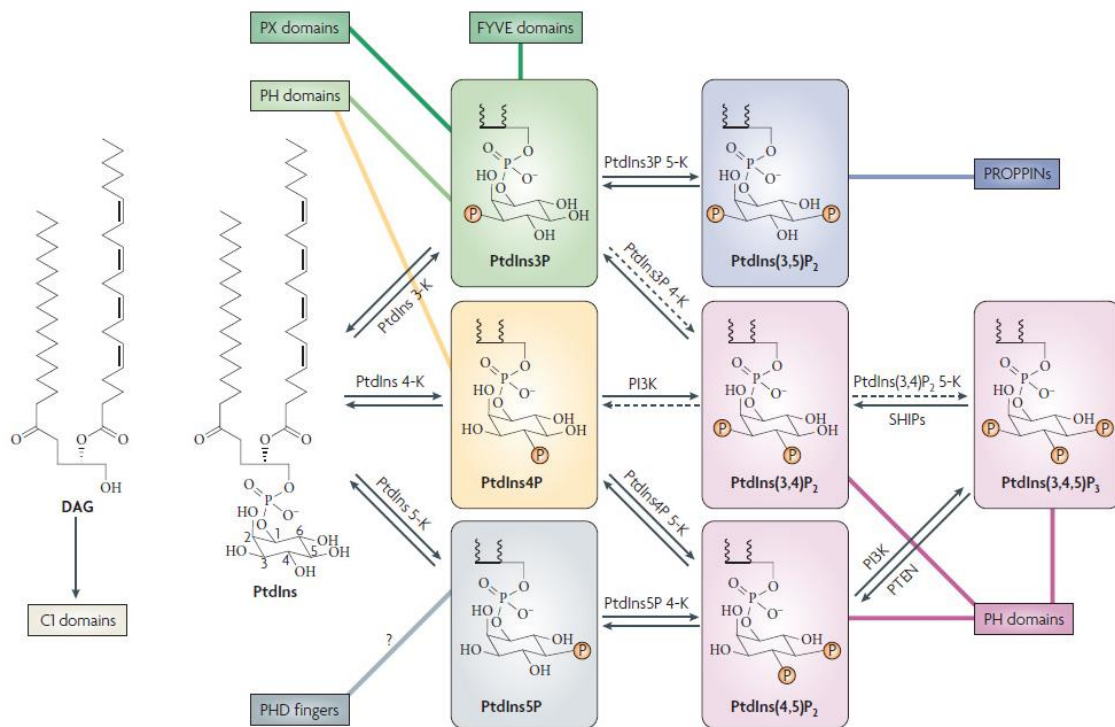


Figura 11. Diferents dominis proteics d'unió a lípids. En la imatge es mostren totes les reaccions enzimàtiques que catalitzen la formació dels diferents fosfoinosítols, així com també les diferents quinases implicades i les corresponents fosfatases que reverteixen aquests processos. En diferents colors es representen els diferents fosfoinosítols i els dominis proteics amb els que poden interaccionar específicament. Imatge obtinguda i modificada de (Lemmon, 2008).

Les PI3K de classe I es troben properes als diferents receptors de la membrana plasmàtica i poden generar PIP3 que, malgrat assolir concentracions fisiològiques 10 o 20 vegades inferiors que les del seu precursor PIP2, és reconegut de forma altament específica per les proteïnes que presenten dominis PH com la PKB. D'altra banda les PI3K de classe II i III es troben pròximes a membranes d'endosomes on generen Pdtlns-3-P, que és reconegut majoritàriament per proteïnes que presenten dominis PX com l'SGK3. Les PI3K de classe III estan més relacionades amb la regulació del tràfic vesicular relacionat a processos de fagocitosi, endocitosi, autofàgia, així com també en l'activació de la traducció proteica protagonitzada per la S6K i induïda per aminoàcids (Compans and Cooper, 2008; Lemmon, 2008; Vanhaesebroeck et al., 2010; Bago et al., 2014).

La desregulació de la PI3K a través de mutacions que atenuen aquesta via contribueixen a trastorns del metabolisme com l'aparició de diabetis tipus 2 i afectacions en el creixement cel·lular i la síntesi proteica dependents del mammalian target of rapamycin complex-1 (mTORC1); mentre que si la conseqüència de la mutació és una sobre activació de la via donarà lloc a alteracions a nivell de proliferació cel·lular com les que succeeixen a la majoria de càncers humans. Les primeres associacions de la PI3K amb càncer varen ser en l'estudi de cèl·lules transformants que presentaven nivells augmentats de PIP3, però no va ser fins als 1990 quan es varen detectar, en els càncers humans més avançats, delecions del locus 10q23 corresponents on mapa el gen de la fosfatasa de PIP3, PTEN (Taula 1). A partir d'aquí i fins a l'actualitat s'han anat descobrint diferents mutacions puntuals o amplificacions en diferents proteïnes de la via de la PI3K que desencadenaven una sobre activació d'aquesta via (Engelman et al., 2006).

Genetic mutations	Cancer type	Percentage frequency	Genetic mutations	Cancer type	Percentage frequency
<i>PIK3CA (p110α)</i>			<i>PTEN</i>		
Mutations	Breast	26% (176/684)	Loss of heterozygosity	Glioblastoma	54% (98/180)
	Colon	26% (88/337)		Prostate	35% (88/250)
	Glioma	8% (14/182)		Breast	23% (37/164)
	Hepatocellular	36% (26/73)		Melanoma	37% (53/143)
	Ovarian	10% (35/365)		Gastric	47% (14/30)
	Lung	2% (4/253)	Mutations [†]	Glioblastoma	28% (122/432)
	Gastric	7% (24/338)		Prostate	12% (26/218)
				Breast	0% (0/164)
Amplifications	Head and neck	42% (54/128)	Melanoma	8% (15/185)	
	Thyroid	9% (12/128)	Gastric	0% (0/30)	
	Lung:		<i>AKT</i>		
	Squamous cell	66% (46/70)	Amplifications	Ovarian	12% (18/147)
	Adenocarcinoma	5% (4/86)		Pancreatic	20% (7/35)
	Breast	9% (8/92)		Breast	3% (3/106)
	Gastric	36% (20/55)		Gastric	20% (1/5)
	Oesophageal adenocarcinoma	6% (5/87)		Head and neck	30% (12/40)
	Cervical	69% (11/16)	<i>PIK3R1 (p85α)</i>		
			Mutations	Ovarian	4% (3/80)
		Colon		2% (1/60)	

Taula 1. Freqüència de mutació en la via de la PI3K-PKB en càncer. Descripció del tipus de càncer i la freqüència d'aparició com a conseqüència de mutacions, amplificacions o pèrdues d'heterozigotitat en els diferents gens descrits a la taula. Taula obtinguda i modificada de (Engelman et al., 2006).

D'altra banda, la PI3K també juga un paper important en el sistema nerviós central (SNC) controlant els processos de migració neuronal, plasticitat sinàptica, neurogènesi, supervivència i mort neuronal. Mutacions puntuals en les diferents subunitats catalítiques de les PI3K de classe I es troben associades, d'una forma específica, a diferents desordres mentals (Fig.12) (Gross and Bassell, 2014).

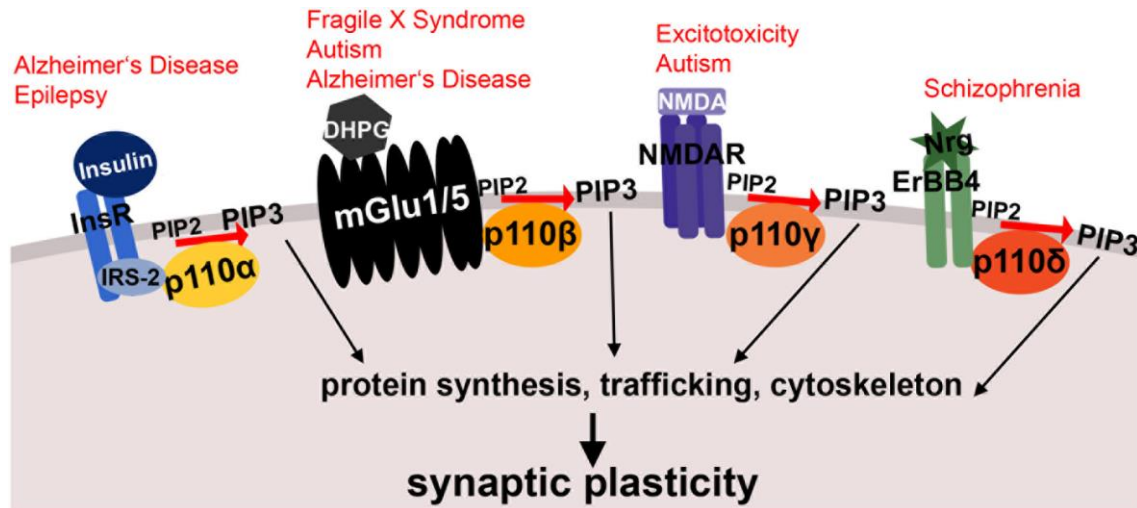


Figura 12. Representació il·lustrativa dels diferents receptors neuronals i la senyalització dependent de les subunitats de les PI3K de classe I. Es mostra la implicació de la via de la PI3K en els diferents desordres mentals, que es troben associats a l'especificitat de la subunitat de la PI3K pel corresponent receptor neuronal. Imatge obtinguda de (Gross and Bassell, 2014).

1.3 Regulació de la via de la PI3K

La via de la PI3K, tal i com hem vist anteriorment, és activada a sistema nerviós central a través de receptors ionotròpics com els *N*-Methyl-D-aspartate receptors (NMDA-R) o els α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors (AMPA-R), receptors GPCR acoblats a proteïnes G activables per neurotransmissors, així com també a través de receptors tirosina quinasa, com els Trk, activables per neurotrofines. L'activació de la PI3K comporta la generació de PIP3 que permet reclutar, a la membrana plasmàtica, diferents proteïnes que presenten dominis PH, com són la 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDK1) i la PKB. En estat basal, PDK1 es localitza a la membrana plasmàtica gràcies a què interacciona amb lípids aniónics com la fosfatidilserina a través dels aminoàcids bàsics propers al seu domini PH (Lucas and Cho, 2011), i es troba constitutivament activa com a conseqüència de la autofosforilació en trans de la serina 241 al loop d'activació del domini quinasa (Casamayor et al., 1999a; Komander et al., 2005; Lucas and Cho, 2011). En canvi, PKB resta inactiva al citosol i només es transloca a membrana responenent als augments de PIP3 previs a la desacetilació dels residus inclosos al domini PH per part de les sirtuin1 (SIRT1) i sirtuin2 (SIRT2) en processos dependents de la homeòstasi energètica de la cèl·lula (Sundaresan et al., 2011;

Ramakrishnan et al., 2014). Així, en resposta a augments de PIP3, PKB col·localitza a la membrana plasmàtica amb PDK1 i PDK1 s'encarrega de fosforilar-la a la treonina 308, mentre que el complex 2 d'mTOR (mTORC2) fosforila la serina 473. Aquesta fosforilació dual és indispensable per l'activació de PKB. La via és inactivada a través d'un *feedback* negatiu de la p70 ribosomal protein S6 kinase (S6K), i a través de les fosfatases protein phosphatase 2A (PP2A) i PH-domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase (PHLPP) que s'encarreguen de defosforilar la treonina 308 i la serina 473 respectivament i actuen per tant com a gens supressors de tumors (Alessi et al., 1997; Harrington et al., 2004; Bayascas and Alessi, 2005; Gao et al., 2005; Sarbassov et al., 2005). Per tant es podria pensar que les respostes generades per les PI3K podrien ser atribuïdes, amb caràcter general, a PDK1 i PKB i als corresponents substrats que regulen.

1.4 Família de les AGC quinases

Les proteïnes quinasa són enzims reguladors que catalitzen l'addició d'un grup fosfat en residus de Serina, Treonina o Tirosina dels seus substrats, provocant-los així canvis conformacionals que impliquen alteracions en les seves funcions (Fig.13A). Entre les 518 quinases que conformen el quinoma humà es va descobrir un grup de 60 Serine/Treonine quinases que varen ser anomenades AGC quinases en referència a l'homologia que presenten el seu domini catalític amb el de les quinases c-AMP dependent protein kinase 1 (PKA), c-GMP dependent protein kinase (PKG) i protein kinase C (PKC) (Fig.13B).

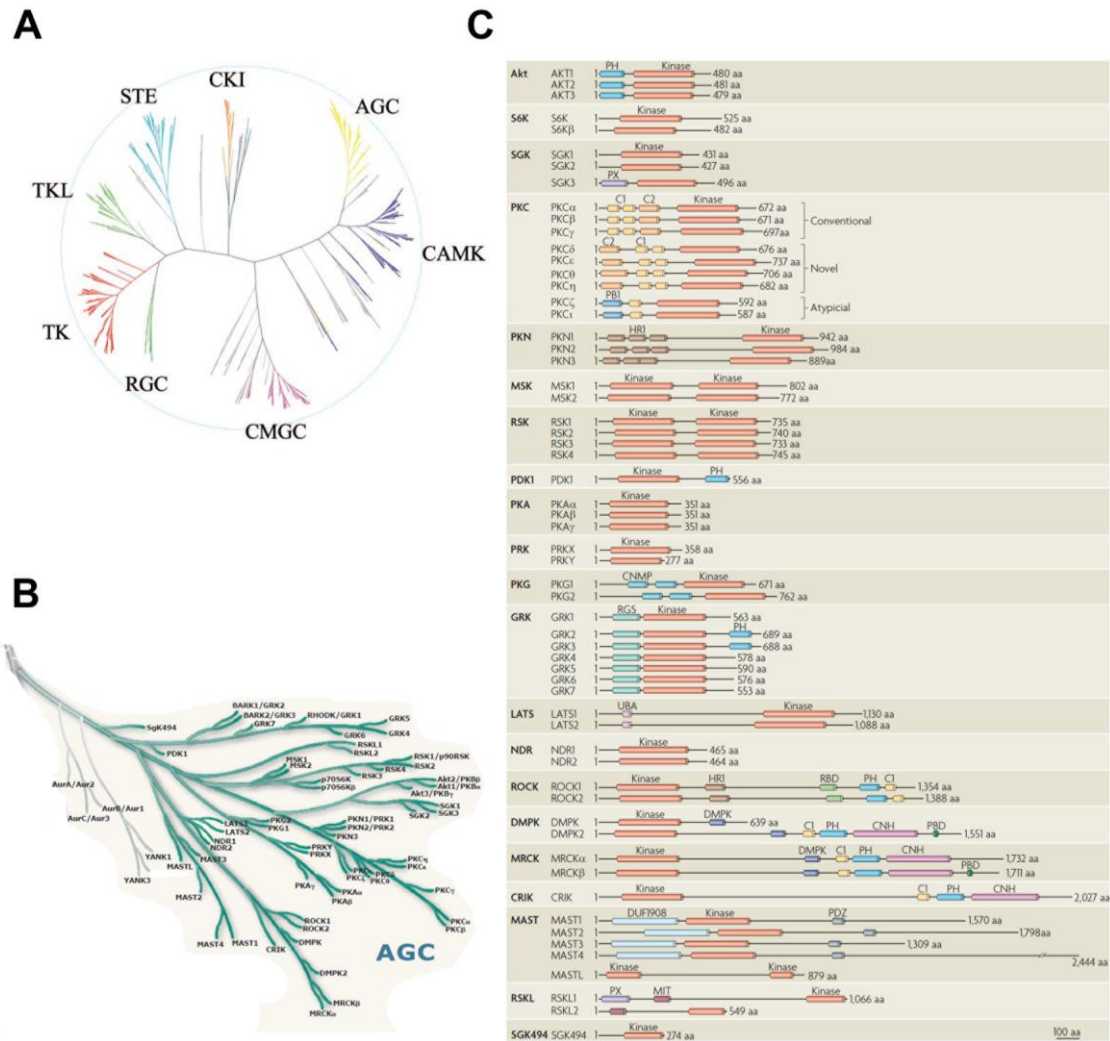


Figura 13. Família de les AGC: procedència, membres que la conformen i estructura dels seus dominis. (A) Dendograma dels 491 dominis corresponents als 478 gens de les eucariotic protein kinases (ePK). Els grups principals es troben indicats amb diferents coloracions i són els homòlegs of yeast Sterile 7 Sterile 11, Sterile 20 kinases (STE), el Casein kinase 1 (CKI), les Containing PKA, PKG, PKC families (AGC), el Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CAMK), el Containing CDK, MAPK, GSK3, CLK families (CMGC), el receptor guanylate cyclase (RGC), el Tyrosine kinase (TK) i el Tyrosine kinase-like (TKL). (B) Dendograma de la família de les AGC quinases on s'inclouen tots els membres que la conformen. (C) Representació de l'estructura dels diferents dominis que contenen les quinases de la família de les AGC. Tots els membres d'aquesta família presenten homologia pel domini quinasa i alguns en presenten per dominis indispensables en la via de la PI3K com els dominis PH i PX. Imatges obtingudes i modificades de (Manning et al., 2002; Pearce et al., 2010).

Els membres de la família de les AGC quinases comparteixen una elevada homologia estructural i un mateix mecanisme d'activació per fosforilació de

dues regions altament conservades: el T-loop ubicat al domini catalític i l'hidrofòbic motif (H-motif) present en la regió adjacent no catalítica del domini quinasa (Fig.13C). També alguns membres d'aquest grup tenen un tercer domini anomenat el turn motif que està implicat en mantenir la integritat de la quinasa i protegir-la de la defosforilació (Manning et al., 2002; Pearce et al., 2010).

1.5 PDK1 i les quinases dependents del PIF-pocket

PDK1 es troba entre les quinases evolutivament més ancestrals d'aquesta família i està codificada al genoma per un gen de còpia única que dona lloc a una proteïna de 556 aminoàcids. PDK1 presenta un domini globular a l'extrem N-terminal corresponent al domini quinasa i un altra a l'extrem C-terminal corresponent al domini PH d'interacció amb PIP3 (Fig.14C). Dins del domini quinasa s'hi troba la regió corresponent al T-loop que conté la Ser241 (Fig.14A), una butxaca hidrofòbica anomenada PDK1 interacting fragment pocket (PIF-pocket) i una α C-hèlix que comunica aquestes dues regions amb l'extrem N-terminal i que actuaria mantenint la quinasa activa en un equilibri enzimàtic dependent de la presència del substrat fosforilat (Biondi, 2002).

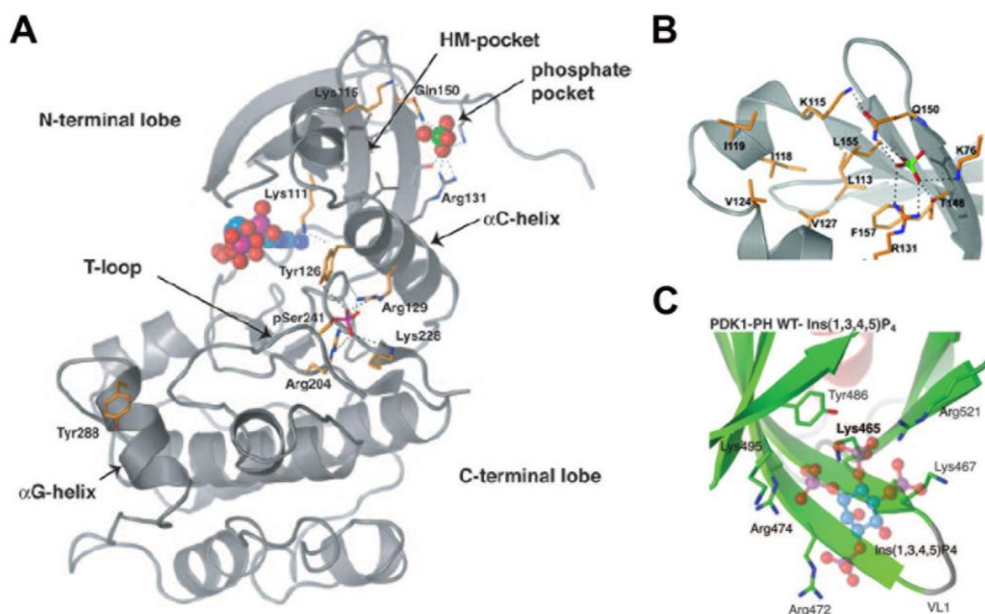


Figura 14. PDK1 i els seus dominis d'activació: el PIF-pocket i el PH-domain. (A) Estructura del domini quinasa de la proteïna PDK1. Les fletxes indiquen les diferents regions

funcionals de la quinasa. Els residus indicats amb taronja o gris, representen els aminoàcids indispensables pel funcionament d'aquestes regions i els quals han estat dianes de mutació per estudiar el seu paper en l'estructura de cada regió. Les esferes vermelles representen els àtoms d'oxigen; en blau, el de nitrogen i en porpra, els fòsfors. (B) Imatge del domini PIF-pocket de PDK1 on en gris es mostra l'esquelet hidrocarbonat; en taronja, les cadenes laterals dels aminoàcids que conformen el domini i una línia negra discontinua mostra les interaccions per pont d'hidrogen dels anteriors residus amb l'ió sulfat. (C) Cristall del domini PH de PDK1 on es mostra la interacció dels aminoàcids indicats en verd amb el PIP3 on es representen en blau, l'anell inositol i en porpra/vermell, els grups fosfats. Les imatges han estat obtingudes de (Biondi, 2002; Komander et al., 2005; Bayascas et al., 2008a).

El PIF-pocket va ser descobert al observar que aquesta butxaca hidrofòbica en el domini quinasa de PDK1 era capaç de reconèixer una regió de la protein kinase C-related kinase-2 (PRK2) anomenada PDK1 interacting fragment (PIF) (Fig.14B). Mutacions puntuals d'aquest domini d'interacció, inhabilitaven la unió de PDK1 amb el seu substrat i disminuïen la capacitat de fosforilar-lo in vitro (Biondi et al., 2000).

Mentre que PKB és activada per mecanismes dependents del domini PH, el que garanteix una resposta ràpida davant d'un estímul agut; les quinases de la família de les AGC que no presenten PH-domain requereixen de la fosforilació prèvia en la seqüència Phe-Xaa-Xaa-Phe/Tyr-Ser/Thr-Phe/Tyr de l'extrem C-terminal corresponent al motiu hidrofòbic, fet que genera un docking site que pot ser reconegut pel PIF-pocket de PDK1. Un cop unida, PDK1 fosforila el T-loop de la corresponent AGC quinasa, el que permet que el motiu hidrofòbic fosforilat interaccioni amb una butxaca hidrofòbica de la pròpia quinasa homòloga al PIF-pocket de PDK1, estabilitzant així la AGC quinasa en la seva conformació activa (Balendran et al., 2000; Bayascas, 2010). Val a dir que en absència del mecanisme d'activació de PKB dependent del PH-domain, PDK1 també pot reconèixer el motiu hidrofòbic de PKB fosforilar el seu T-loop i contribuir a la seva activació (Fig.15) (Najafov et al., 2012; Zhou et al., 2014).

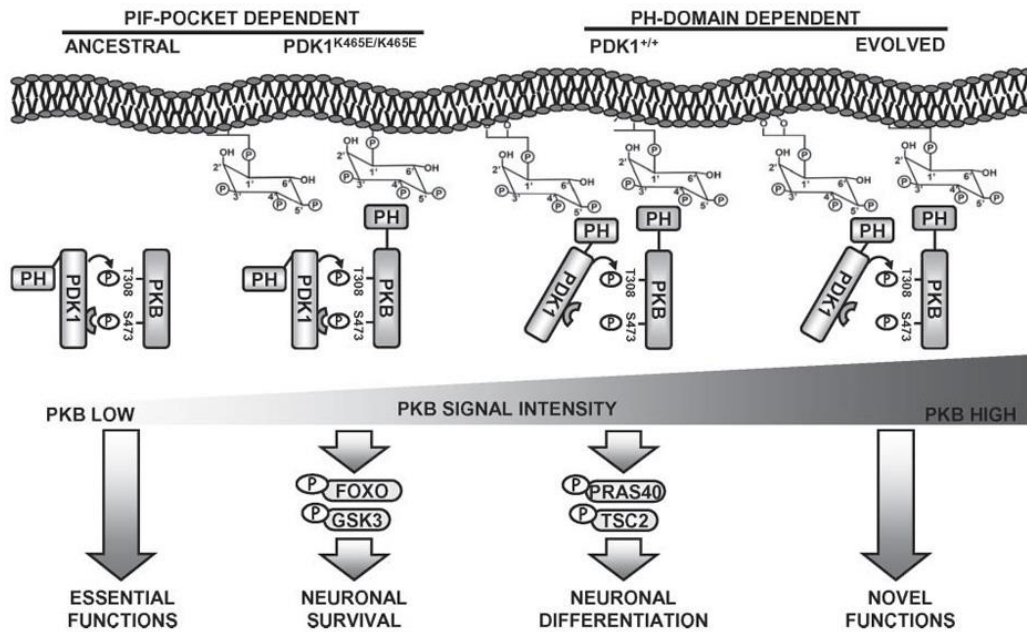


Figura 15. Model on es mostra l'evolució dels mecanismes d'activació de PKB. En la imatge es representa la relació del domini PH de PDK1 amb l'evolució de la complexitat de les respostes cel·lulars associades a PKB. Els ratolins $PDK1^{K465E/K465E}$, PKB és activada d'una forma PIF-pocket dependent i per tant es preserven només les respostes bàsiques de supervivència; mentre que els ratolins que no presenten la mutació, PKB és activada d'una forma més ràpida i dependent del PH-domain de PDK1 a fi de preservar tant les respostes simples i més ancestrals com les més evolucionades i complexes. Imatge obtinguda de (Zhou et al., 2014).

Entre les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1 trobem la S6K, la p90 ribosomal S6 kinase (RSK), la SGK i les diferents PKC, que seran fosforilades diferencialment en el seu motiu hidrofòbic per la corresponent quinasa (Fig.16A). Concretament, la S6K és fosforilada per l' mTORC1 en la treonina 389 de l'HM; això permetrà la posterior activació de la proteïna a través de la fosforilació de la serina 229 en el T-loop per part de PDK1 (Fig.16B). En canvi la RSK, que presenta dos dominis quinasa catalíticament actius, requereix que la proteïna ERK s'uneixi i fosforili la treonina 573 del domini quinasa de l'extrem C-terminal perquè aquest fosforili la serina 380 de la regió *linker*, creant el docking site que serà reconegut pel PIF-pocket de PDK1 i permetrà la conseqüent fosforilació de la serina 227 en el T-loop del domini quinasa ubicat a l'extrem N-terminal (Fig.16C) (Pullen et al., 1998; Frödin et al., 2000, 2002).

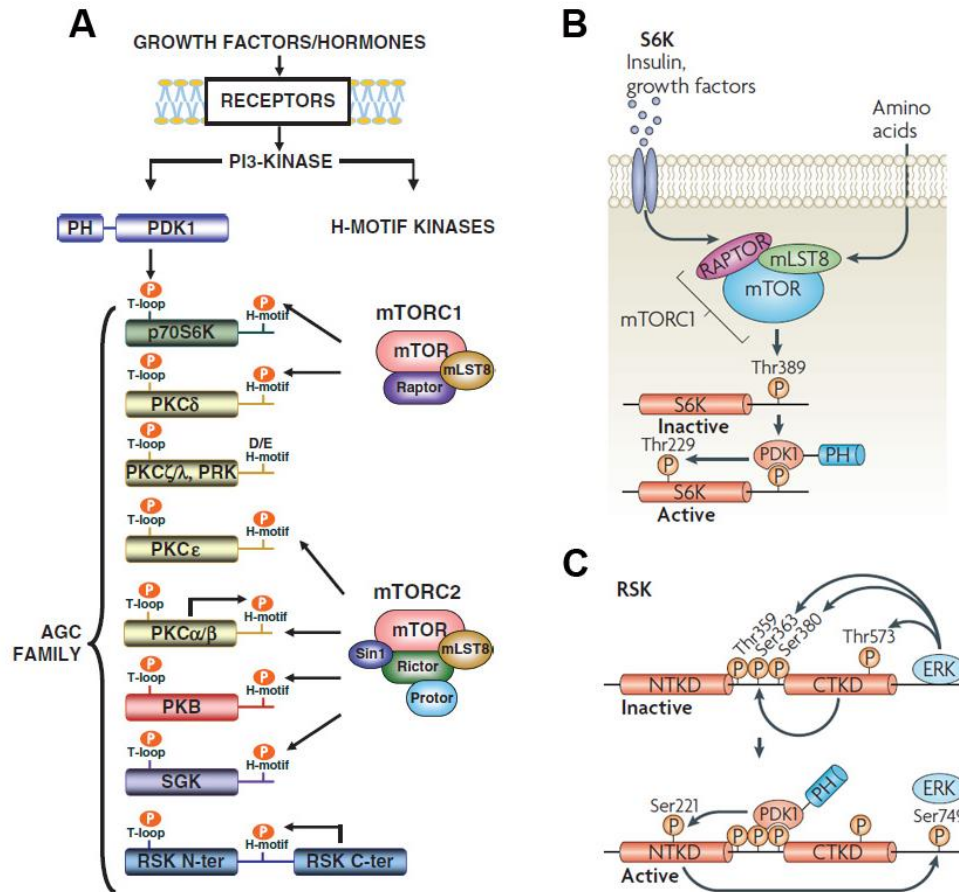


Figura 16. Activació de les AGC dependents de la via de la PI3K. (A) Mecanisme d'activació de les AGC quinases a través de la fosforilació dual de l'H-motif pel corresponent complex d'mTOR i del T-loop, per PDK1. (B) Esquema del mecanisme d'activació de l'S6K sota l'estímul de factor tròfic, on es mostren els diferents residus fosforilats, indicats amb taronja, i les corresponents quinases que les realitzen (C) Representació del mecanisme d'activació per autofosforilació de RSK, on es mostren els diferents residus fosforilats, indicats amb taronja, i les corresponents quinases que les realitzen. Imatges extretes i modificades de (Bayascas, 2010; Pearce et al., 2010).

D'altra banda el grup de les PKC es divideix en les PKC convencionals α, β i γ que són activades al·lostèricament per Ca^{2+} i DAG mentre que les noves PKCs formades per les isoformes δ, ϵ, η i θ són activades únicament per DAG (Fig.17B). Les PKC convencionals α, β i γ i la no convencional ϵ serien fosforilades en el motiu hidrofòbic per mTORC2, mentre que la fosforilació de l'HM de la resta de les noves PKC (δ, η i θ) és sensible a la rapamicina i per tant dependria de l'mTORC1, tot i que hi ha certa controvèrsia i molt per estudiar sobre la regulació de la fosforilació de les PKC en el seu motiu hidrofòbic

(Fig.17A). Hi ha un tercer grup de PKC anomenades atípiques formades per les PKC ζ i λ i les PKC-related kinases (PRK) que no són activables al·lostericament ni per Ca^{2+} ni DAG i els aminoàcids Ser/Thr del seu motiu hidrofòbic es troben substituïts per aminoàcids àcids (Asp o Glu) que mimetitzen la fosforilació d'aquest domini. El motiu hidrofòbic de les PRK és així reconegut constitutivament pel PIF-pocket de PDK1 i habilita la fosforilació d'aquestes quinases en el T-loop d'activació (Fig16A). La fosforilació del motiu hidrofòbic de les diferents PKC es veu afavorida també per la interacció de la xaperona heat shock protein 90 (HSP90) i la co-xaperona Cdc37 amb el domini PXXP clamp d'aquestes quinases, evitant així la seva degradació com també passa amb altres proteïnes com la ERK5 (Balendran et al., 2000; Newton, 2001, 2010; Ikenoue et al., 2008; Bayascas, 2010; Erazo et al., 2013).

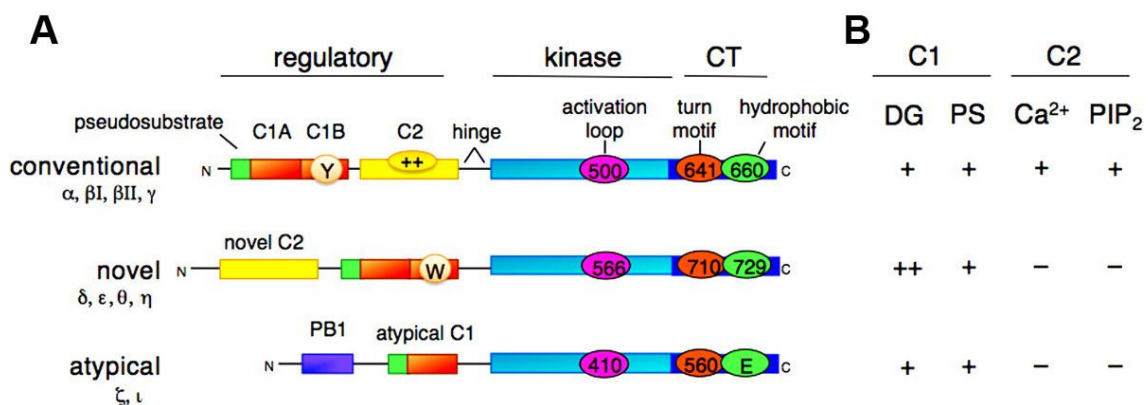


Figura 17. Classificació de les PKC i afinitat pels diferents lípids de membrana. (A) Estructura dels dominis dels diferents membres que formen la família de les PKC. El canvi de tirosina/triptòfan (YW) en el domini C1B marca l'afinitat d'aquest domini per les membranes enriquides amb DAG. El domini C2 conté una regió d'aminoàcids bàsics, indicats amb el símbol ++, que permeten la interacció de la PKC amb PIP_2 . La regió *hinge* correspon a una seqüència d'aminoàcids que connecta l'extrem N-terminal amb el C-terminal de la proteïna. (B) Taula on es mostra amb el símbol + l'afinitat dels dominis C1 per diacylglycerol (DG) i phosphatidylserine (PS); així com també el domini C2 pel Ca^{2+} i PIP_2 . Imatge obtinguda i modificada de (Newton, 2010)

Finalment dins d'aquest grup de les quinases dependents de PIF-pocket trobem la serum and glucocorticoid inducible quinase (SGK), l'expressió de la qual es troba regulada per l'estrès cel·lular associat a l'alliberació de glucocorticoids que interaccionen amb les seqüències glucocorticoid regulated

elements (GRE) del promotor del gen de la SGK. L'activació d'aquesta quinasa està també associada a la via de la PI3K, concretament l'mTORC2 s'encarrega de la fosforilació en la serina 422 corresponent a l'HM mentre que PDK1, després de reconèixer aquesta primera fosforilació, s'encarregarà de fosforilar la treonina 256 present en el T-loop de la proteïna a fi d'activar-la (Kobayashi and Cohen, 1999; Park et al., 1999; García-Martínez and Alessi, 2008). La SGK és sensible alhora que un bon sensor dels canvis en el volum i osmolaritat cel·lular perquè està implicada en la regulació de diferents canals iònics. Així, l'SGK evita la degradació dels epithelial Na⁺ channels (ENaC) fosforilant i inhibint la E3-ubiquitina proteïna lligasa Nedd4-2. A la vegada, Nedd4-2 poliubiquitina en un feedback negatiu la seqüència PEST present en els últims 60 aminoàcids de la SGK i indueix la seva degradació, mantenint així la homeòstasi del Na⁺ al ronyó (Brickley et al., 2002; Zhou and Snyder, 2005). També s'han descrit altres E3-ubiquitina proteïna lligasa com la C-terminus of Hsp 70-interacting protein (CHIP), responsable de la degradació de la SGK a través de la interacció amb la HSP70; o també la E3-lligasa cullin-1 que promou la ubiquitinació i degradació d'SGK en associar-se a l'element rictor inclòs en el complex d'mTORC2 (Belova et al., 2006; Gao et al., 2010). L'estret vincle entre l'SGK i la lligasa Nedd4-2 també està implicat en el manteniment dels transportadors EAAT4 de glutamat de les cèl·lules de Purkinge, evitant així la citotoxicitat de l'excés de glutamat extracel·lular; en l'expressió de la subunitat GLUR1 dels receptors AMPA a membrana, que està implicat en processos de consolidació de memòria; i també, en els transportadors d'aminoàcids SN1 en cèl·lules astrocitàries (Böhmer et al., 2004; Lang et al., 2010).

La SGK presenta moltes semblances amb la quinasa PKB. Ambdues presenten 3 isoformes, on la SGK3 i la PKB γ són les més abundants al sistema nerviós central, i a nivell estructural presenten dominis d'interacció a fosfoinosítids, en el cas de l'SGK3 un domini PX que reconeix PdtIns-3-P mentre PKB presenta un domini PH vinculat a l'activació de la quinasa en increments de PIP3 (Easton et al., 2005; Vanhaesebroeck et al., 2010). D'altra banda, ambdues quinases són activades per PDK1 i mTORC2 i comparteixen alguns substrats en comú com ara l' N-myc downregulated gene 1 (NDRG1) que és fosforilat per l'SGK en condicions basals i per PKB en resposta a estímuls aguts; o el factor

de transcripció forkhead box group O transcription factor 3a (FOXO3a), implicat en l'expressió de gens proapoptòtics (García-Martínez and Alessi, 2008; Zurashvili et al., 2013). Per tant no és tan difícil pensar que aquestes dues quinases puguin intercedir en les mateixes respostes cel·lulars de supervivència i apoptosi (Fig.18).

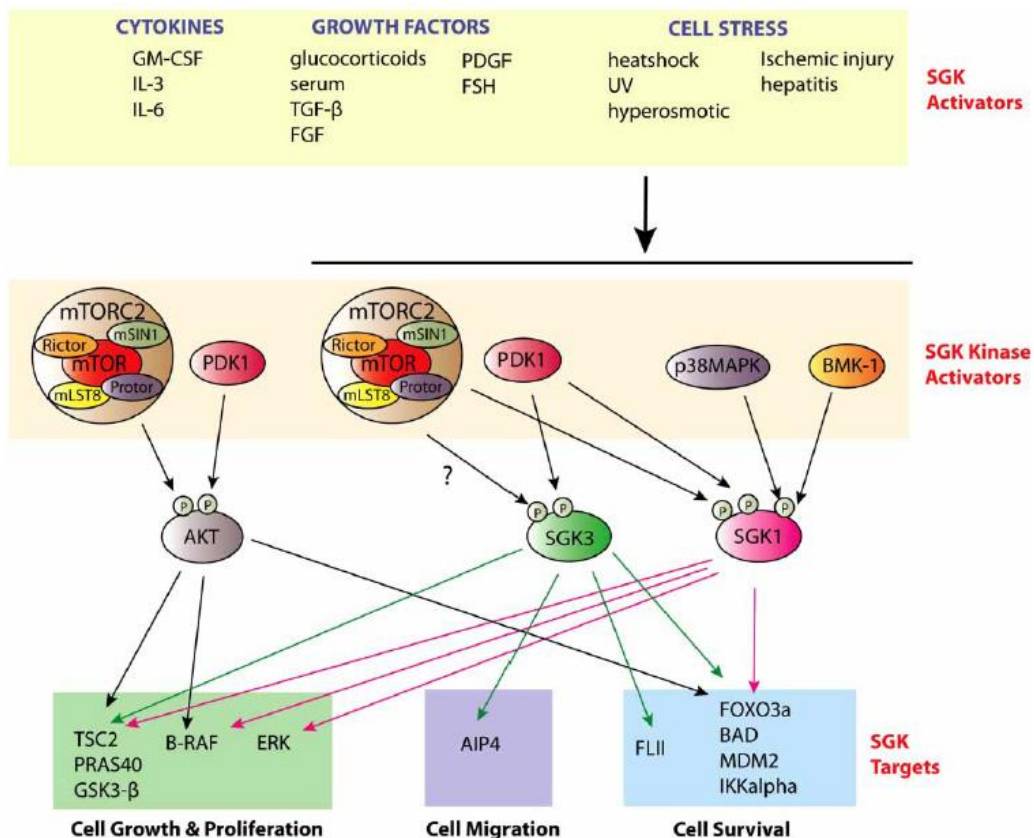


Figura 18. Via d'activació de la SGK. Classificació dels diferents estímuls implicats en l'activació de les isoformes d'SGK a través de la fosforilació del domini H-motif de la quinasa, per part d'mTORC2, i en el T-loop per part de PDK1. En els corresponents requadres s'indiquen els substrats regulats per les diferents isoformes d'SGK i PKB i les respostes associades a ells. Imatges obtingudes de (Bruhn et al., 2010).

2. Supervivència i mort neuronal

La paraula apoptosi en grec significa "la caiguda de les fulles dels arbres a la tardor" i es va descriure al anys 1970 com aquell conjunt de fenòmens que porten a l'eliminació, d'una forma programada, de diferents cèl·lules d'una població. Aquest procés comporta una condensació nuclear i citoplasmàtica que condueix a una fragmentació cel·lular, on els fragments generats són

reconeguts i fagocitats ja sigui per les cèl·lules epitelials, fibroblasts adjacents o cèl·lules del sistema immunitari (Fig.19A), les quals processaran i acabaran degradant aquests fragments en vesícules lisosomals (Kerr J. F. R., Wyllie A. H., 1972). La mort cel·lular programada és molt important en els processos de consolidació dels óssos, on els osteòcits i els osteoclasts participen en l'eliminació dels condrocits i la consegüent calcificació del cartílag; en la formació del blastocist; en l'eliminació de la cua del capgròs en el procés de metamorfosis d'alguns amfibis; durant el desenvolupament embrionari, amb el clar exemple de l'eliminació de les cèl·lules que formen les membranes interdigitals per acabar donant l'extremitat en els mamífers (Fig.19B); i sobretot durant el desenvolupament neuronal (Gilbert, 2000; Alberts et al., 2008).

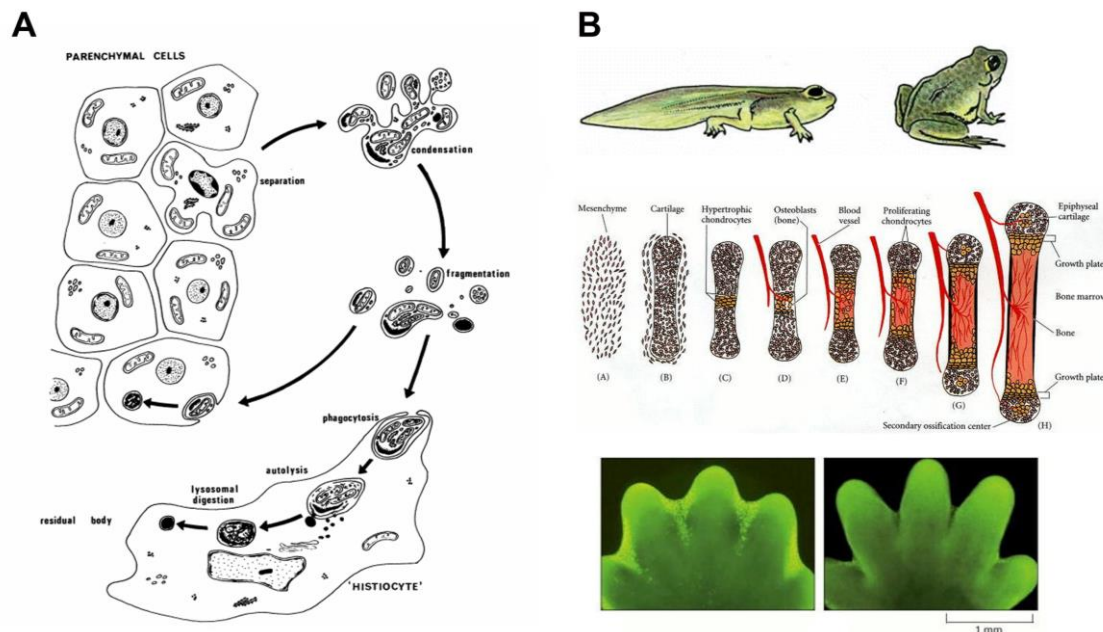


Figura 19. Apoptosis: de la cèl·lula a l'organisme. (A) Diagrama on es mostra els diferents processos que ocorren en una cèl·lula apoptòtica. (B) Conseqüències fenotípiques, a nivell macromolecular i en diferents organismes, d'una mort cel·lular programada. En la imatge superior es mostra la pèrdua de la cua del capgròs, associada a l'apoptosi de les cèl·lules que la conformen, durant el procés de metamorfosis a la granota. La imatge central representa el procés d'osteogènesi en què, a través de fenòmens apoptòtics, es substitueix el cartílag per matriu òssia. En la imatge inferior s'observa la pèrdua de les membranes interdigitals durant el desenvolupament embrionari d'un ratolí. Imatges obtingudes de (Kerr J. F. R., Wyllie A. H., 1972; Gilbert, 2000; Alberts et al., 2008).

En el sistema nerviós central, un cop tots els processos de desenvolupament s'han donat i per tan la mort cel·lular programada genèticament ha finalitzat, es desencadenen un conjunt de respostes en les neurones postmitòtiques que són desencadenades per l'activitat sinàptica, per diferents neurotransmissors i per diferents neurotrofines a fi d'evitar l'apoptosi. Aquests diferents estímuls són els responsables d'inhibir aquest procés i promoure la supervivència neuronal, com hem vist que ho feia l'NGF en les neurones del gangli dorsal del sistema nerviós perifèric en els experiments de Rita Levi Montalcini dels anys 1980 (Levi-montalcini, 1987; Oppenheim, 1991). Com hem vist abans, les diferents neurotrofines regulen, a través dels receptors Trk i p75, els fenòmens de supervivència i apoptosi neuronal a través de dues vies de senyalització principals: la via de la PI3K-PKB i la via de les Ras/Raf MAPK.

En la via de la PI3K hi ha diferents quinases sota el control de la màster quinasa PDK1 que regulen aquestes respostes de supervivència neuronal, però la principal i a la que històricament se li ha atribuït un paper central és PKB.

2.1 Eix PI3K/PKB/GSK3 en la supervivència neuronal

En cèl·lules de mamífer, PKB està codificada per 3 gens diferents ubicats en 3 cromosomes diferents que codifiquen per 3 isoformes de la quinasa amb un 80% d'homologia de seqüència: PKB α , PKB β i PKB γ . A través dels diferents models murins de ratolí *knockout* per cadascuna de les tres isoformes es va poder descobrir en quines respostes cel·lulars estaven implicades a diferents teixits. La isoforma PKB α és indispensable per la supervivència i proliferació cel·lular, ja que els ratolins deficients per aquesta isoforma moren poc després de néixer com a conseqüència de greus problemes en el desenvolupament. Els ratolins *knockout* per les isoformes PKB β i γ presenten un desenvolupament normal i arriben a néixer i sobreviure, tot i mostrar defectes a nivell de creixement. La PKB β té un paper indispensable en l'homeòstasi i el metabolisme de la glucosa a través de la seva expressió en els teixits diana de la insulina com són el fetge, múscul, teixit adipós i pàncrees. Els ratolins deficients per PKB β presenten una diabetis severa (hiperglicèmia, hiperinsulinèmia intolerància a la glucosa i incapacitat del múscul per assimilar la glucosa), un augment dels nivells de triglicèrids en sang, una reducció del

teixit adipós dependent de l'edat, una pèrdua de les cèl·lules β dels illots de Langerhans del pàncrees i un reducció de la mida dels teixits associada a una reducció del volum cel·lular (Garofalo et al., 2003; Dummler and Hemmings, 2007). Ratolins deficientes per PKBy presenten també una reducció d'un 20% de la mida del cervell i dels testicles respecte els ratolins salvatges, òrgans on s'expressa de forma més abundant aquesta tercera isoforma de PKB (Fig.20) (Tschopp et al., 2005).

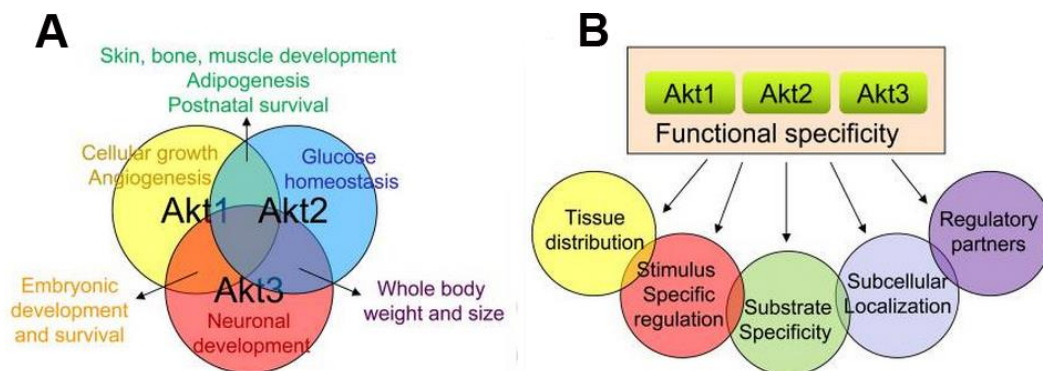


Figura 20. Regulació de la senyalització de PKB. (A) Solapament i especificitat de funcions de les tres isoformes de PKB. (B) Possibles factors que condicionen l'especificitat funcional de les diferents isoformes de PKB. Imatge obtinguda i modificada de (Gonzalez and McGraw, 2009).

PKB és responsable de fosforilar una gran varietat de substrats en seqüències conservades que responen al consens RXXRXX[S/T]B, on R és una arginina, X pot ser qualsevol aminoàcid, S/T pot ser tan un residu de serina com un de treonina, i B correspondria a un aminoàcid hidrofòbic voluminos com els aminoàcids aromàtics (Fig.21). La regulació de molts d'aquests substrats és compartida amb altres quinases activades per PDK1, com són RSK i SGK (Fig.21B), i per tant les respostes atribuïdes històricament a PKB podrien també ser mediades per aquestes altres quinases de la família de les AGC (Alessi et al., 1996; Manning and Cantley, 2007).

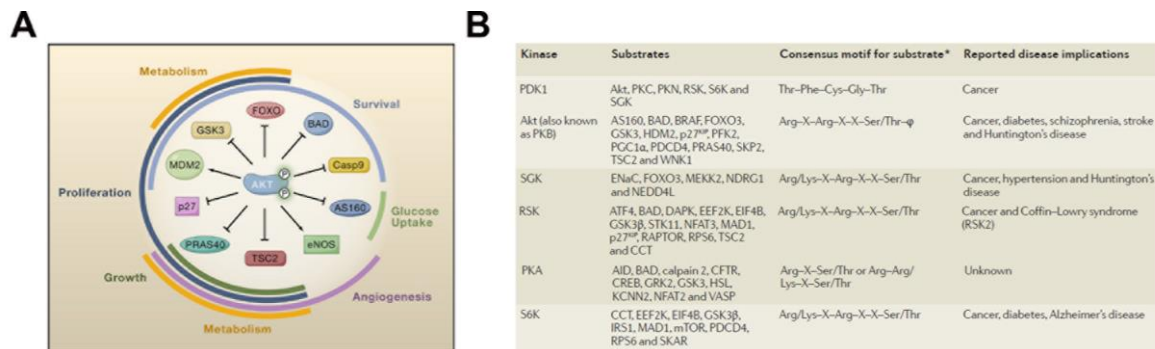


Figura 21. Substrats de PKB responsables de les respostes cel·lulars atribuïdes a aquesta quinasa. (A) Regulació dels diferents substrats de PKB i la seva contribució en les diferents respostes cel·lulars. (B) Taula on es mostren les quinases de la família de les AGC activades per PDK1, els diferents substrats que regulen, i les corresponents seqüències aminoacídiques consens de fosforilació; així com també les diferents malalties associades a la seva desregulació. Imatges obtingudes de (Manning and Cantley, 2007; Pearce et al., 2010).

D'entre els nombrosos substrats de la PKB trobem les isoformes de la glucogen synthase kinase 3 α i β (GSK3 α i GSK3 β), les quals poden ser inhibides en presència d'estímul tròfic per PKB en fosforilar la serina 21 i 9 respectivament (Fig.22A). La inhibició de GSK3 i la defosforilació dels seus substrats (Fig.22D) contribueix en diferents respostes cel·lulars, com ara la homeòstasi de glucosa a través de la defosforilació i activació de la glicogen sintasa, que és l'últim enzim implicat en la biosíntesi de glicogen, així com la síntesi proteica, que regula el creixement cel·lular a través de la defosforilació de l' eukaryotic protein synthesis initiation factor 2B (eIF2B), promovent així l'assemblatge de la maquinària de traducció (Fig.22B). GSK3 també es troba implicada en la progressió del cycle cel·lular i en la supervivència i en la proliferació de la cèl·lula, a través de la defosforilació de c-myelocytomatosis oncogene (c-myc) i de la ciclina D1, evitant així la poliubiquitinació i conseqüent degradació d'aquestes proteïnes. A més a més, GSK3 també s'encarrega de fosforilar al factor de transcripció c-jun en un lloc proper al domini d'unió a DNA, evitant que pugui interaccionar amb la proteïna c-FBJ osteosarcoma oncogene (c-fos) i formar l'adaptor protein complex 1 (AP-1). Aquest complex resulta indispensable per la transcripció de gens necessaris per la progressió de la fase G1 del cycle cel·lular, com la mateixa ciclina D1, o per reprimir l'expressió

de gens com p53 o p21, que arresten a la cèl·lula en aquesta fase del cicle (Fig.22C) (Wisdom et al., 1999; Frame and Cohen, 2001).

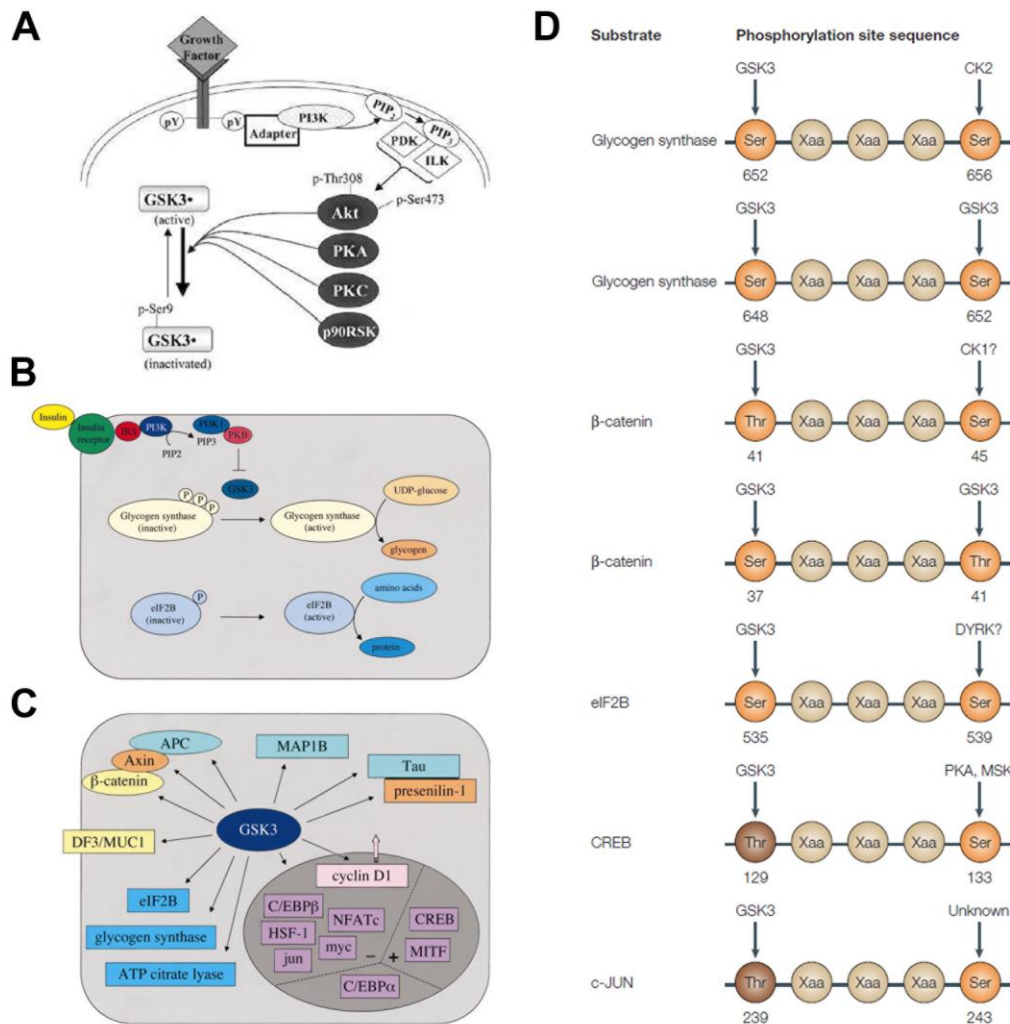


Figura 22. Regulació de GSK3 i els seus substrats. (A) Esquema on es representen les diferents quinases que regulen de forma inhibidòria GSK3β a través de la fosforilació en la serina 9. (B) La insulina estimula la síntesi proteica i de glicogen a través de la inhibició de GSK3. Possibles dianes de GSK3 agrupades i indicades amb diferents colors en funció de la resposta cel·lular en què es troben implicades. (C) Els símbols + i – representen la regulació activadora o inhibidora dels diferents factors de transcripció que es troben sota el control de GSK3. (D) Representació del lloc de fosforilació per GSK3 de diferents substrats i del lloc de fosforilació ubicat a n+4 aminoàcids del lloc de fosforilació de GSK3 que és específic per la corresponent *priming kinase*. Imatges obtingudes de (Frame and Cohen, 2001; Cohen and Goedert, 2004a; Jope and Roh, 2006).

D'altra banda, la GSK3 està vinculada directe o indirectament amb càncer, malalties neurodegeneratives i trastorns de conducta. La majoria de pacients

amb càncer colorectal presenten mutacions en les proteïnes adenomatous polyposis coli (APC) o β -catenina, les quals juntament amb GSK3, l'axina i la casein kinase 1 α (CK1 α) formen un complex que permet a GSK3 fosforilar a la β -catenina, que alhora és poliubiquitinada i enviada a degradació. Si aquest complex és desestructurat a través de l'estímulació apical de la via de wingless-type MMTV integration site family (Wnt), la β -catenina translocarà a nucli on actuarà com a coactivador de factors de transcripció de la família dels T-cell factor (TCF)/ Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF). Aquests factors de transcripció transcriuen gens com el c-myc i la ciclina D1 que es troben implicats, com hem vist abans, en la proliferació cel·lular (Fig.23). També la β -catenina juga un paper important en fenòmens de migració cel·lular durant el desenvolupament neuronal, així com també en processos d'epithelial mesenchymal transition (EMT) en estadis primerencs de metàstasis. Això és degut a la seva interacció amb diverses proteïnes d'adhesió, com poden ser les E-cadherines i les α -catenines, a fi d'ancorar-les al citoesquelet d'actina (Doble, B. W. and R.Woodgett, 2003; Beaulieu et al., 2009; Markowitz and Bertagnolli, 2009; Wu and Pan, 2010).

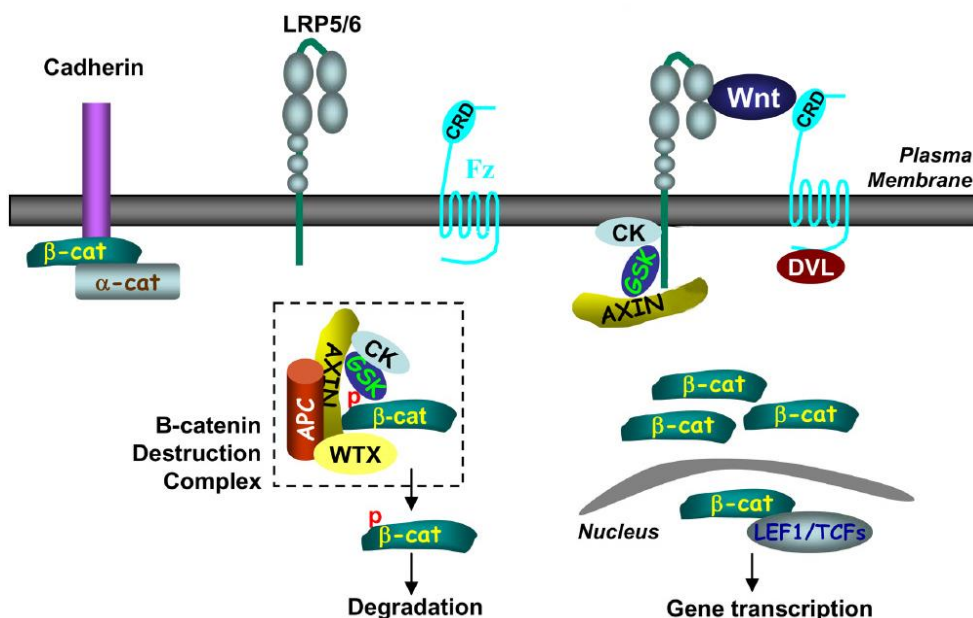


Figura 23. Esquema representatiu de la via de Wnt i la regulació de la β -catenina. Imatge obtinguda i modificada de (Wu and Pan, 2010).

No va ser fins al 1996, amb el descobriment del liti com un potent inhibidor de GSK3, que es va relacionar GSK3 amb malalties de trastorns mentals. El liti actua com a inhibidor competitiu pel lloc d'unió de GSK3 a l'ió Mg^{2+} que resulta indispensable per la unió a ATP. El liti també desestabilitza el complex PKB- β arrestina-PP2A, evitant que PKB sigui defosforilada per aquesta (Fig.24B). Ambdues actuacions es tradueixen en una inhibició de l'activitat de GSK3: directa, per la inhibició competitiva del Li pel Mg^{2+} , i indirecta, per la fosforilació de GSK3 dependent de PKB (Jope, 2003; Beaulieu et al., 2009). GSK3 ha estat associada a trastorns com l'esquizofrènia, associada a una elevada neurotransmissió dopaminèrgica, i la depressió major, associada a una deficient neurotransmissió serotoninèrgica (Fig.24C/D); en ambdós casos es dona una sobreactivació de les vies regulades pels corresponents receptors de dopamina D2 i de serotonina 5HT2, o una inhibició de les seves corresponents isoformes D1 i 5HT1. (Jope and Roh, 2006). També es va descobrir en diferents demències i malalties neurodegeneratives mutacions en la proteïna Tau, que pertany a la família de les microtubule-associated proteins (MAP), la qual pot ser fosforilada per diferents proteïnes i entre elles GSK3. La hiperfosforilació de Tau comporta que no pugui interaccionar amb els microtúbuls, donant lloc a la formació de filaments insolubles que provocaran la típica degeneració de les cèl·lules nervioses que té lloc a les diferents taupaties (Fig.24A) (Cohen and Goedert, 2004b).

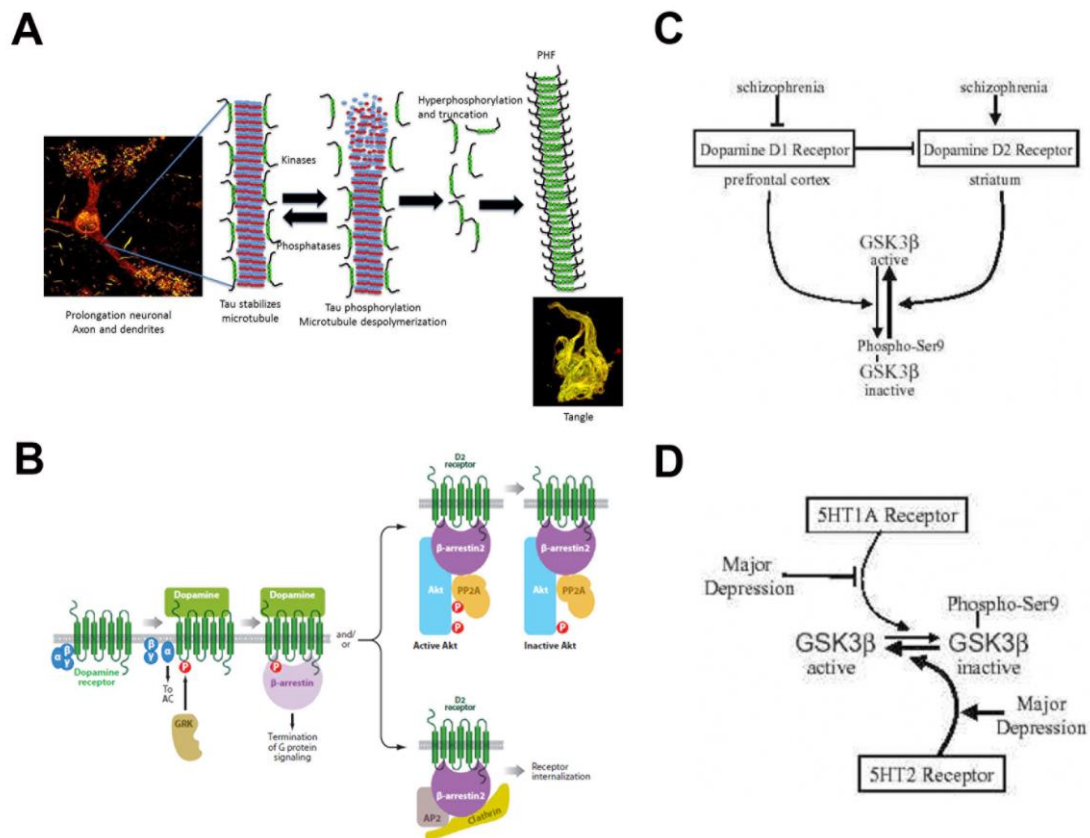


Figura 24. Diferents vies de senyalització regulades per GSK3 i associades a desordres mental o malalties neurodegeneratives. (A) Esquema on es representa com la proteïna Tau aberrant acaba comportant el col·lapse dels microtúbuls i la formació dels cabdells de Tau en la malaltia neurodegenerativa de l'Alzheimer. (B) En presència de dopamina, la quinasa G-protein coupled receptor kinase (GRK) fosforila el receptor D2 de dopamina i permet la formació del complex β -arrestina/PP2A/PKB i la conseqüent finalització de la senyalització dependent de PKB. (C) Descripció esquemàtica de la regulació de GSK3 dependent del receptors D1 i D2 de dopamina i els canvis associats a l'esquizofrènia. (D) Esquema on es representa la regulació de GSK3 a través dels receptors 5HT1A i 5HT2, així com també la seva relació amb la depressió major. Imatges obtingudes de (Jope and Roh, 2006; Beaulieu et al., 2009; Aso and Ferrer, 2013)

2.2 El denominador comú d'SGK i PKB: FoxO

Una de les grans pedres filosofals de la via de la PI3K és el substrat de PKB forkhead box O (FoxO) o també anomenat forkhead in rhabdomyosarcomas (FKHR). Aquest factor de transcripció es troba regulat, com hem vist abans, per una quinasa dependent del PIF-pocket de PDK1, SGK, i per una quinasa dependent del PH-domain de PDK1, PKB. En ratolins s'expressen les isoformes FoxO1, 3 i 4 que es troben principalment al citoplasma i FoxO6 que

és nuclear. Només les variants 1, 3 i 6 s'expressen de forma dinàmica tan en el cervell en desenvolupament com en l'adult i totes les podem localitzar en la regió hipocampal, on principalment es donen processos d'aprenentatge i la neurogènesi secundària adulta. Això deixa entreveure el paper imprescindible que juguen les diferents isoformes de FoxO, i en particular FoXO6, en la consolidació de la memòria i la funció sinàptica. Per la seva banda, FoXO3 s'encarrega de la homeòstasi de les neuronal stem cells (NSC), que és l'eina principal de regeneració del teixit nerviós, indispensable per mantenir-lo en condicions òptimes, tot beneficiant l'organisme amb un augment de la longevitat (Hoekman et al., 2006; Salih et al., 2012; Webb et al., 2013).

El mecanisme pel qual FoxO intercedeix en aquestes respostes cel·lulars consisteix en què, sota l'estímul d'algun factor tròfic, PKB i SGK són activades via PI3K-PDK1 i s'encarreguen de fosforilar a FoxO, creant un docking site per les proteïnes 14-3-3, que al seu torn retenen FoxO al citoplasma i eviten que transloqui a nucli (Brunet et al., 2001). En canvi, FoxO és retingut al nucli si prèviament és fosforilat en altres residus per quinases de resposta a estrès cel·lular com la 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), la Jun-N-terminal kinase (JNK), la extracel·lular signal regulated kinase (ERK) o la p38 mitogen activated protein kinase (MAPK). Com a conseqüència es promou la transcripció selectiva, dependent de la desacetilasa SIRT1 que elimina les acetilacions promogudes per les acetilases CBP i p300, de gens associats a la resistència a l'estrès, i es disminueix la dels gens vinculats a l'apoptosi (Brunet et al., 2004; Webb and Brunet, 2014). Els gens apoptòtics són transcrits en absència d'estímul extracel·lular, on PKB i SGK es troben inactives i per tant permeten que FoXO transloqui a nucli gràcies al fet que presenta una nuclear localization sequence (NLS) que és reconeguda per la importina α de la membrana nuclear (Fig.25) (Brownawell et al., 2001).

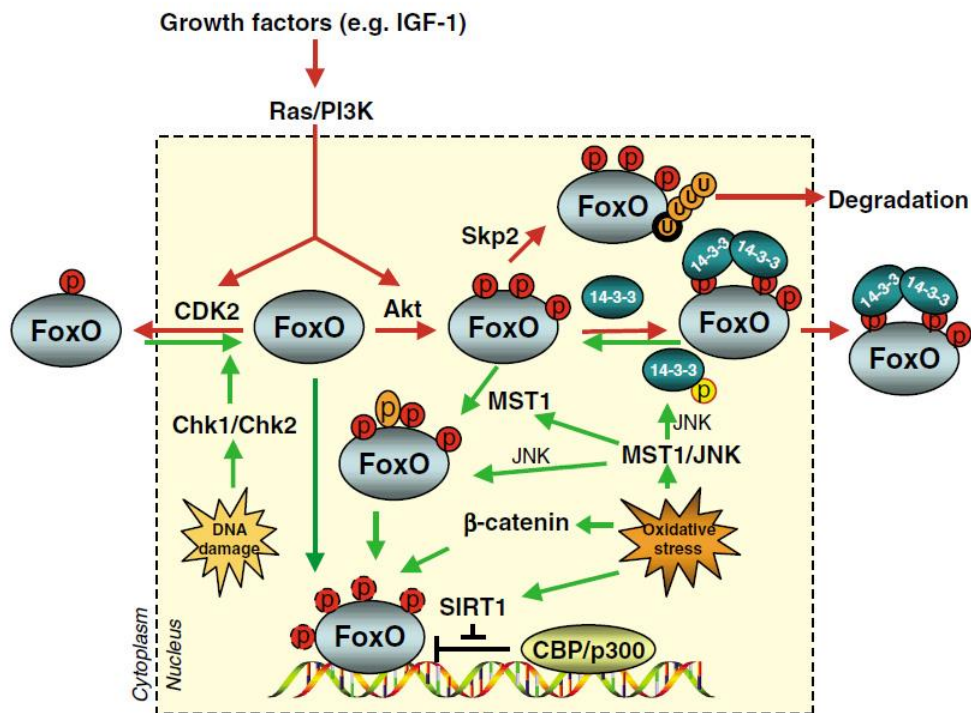


Figura 25. Regulació de FoxO en resposta a estímuls externs i intracel·lulars. Imatge obtinguda i modificada de (Huang and Tindall, 2007).

FoxO regula molt finament l'expressió d'aquesta gran varietat de gens a través de les FoxO regulatory elements (FRE), seqüències que es troben en els seus promotors, i ho fa d'una forma dependent de les modificacions postraduccionals que pateixi ja siguin fosforilacions, acetilacions o desacetilacions, així com dels altres factors de transcripció amb qui interaccioni.

D'entre tots els gens proapoptòtics, FoxO regula l'expressió del gen Fas Ligand (FasL), del tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) i de la Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim), que és una proteïna del subgrup de proteïnes de la família B cell leukemia/lymphoma 2 (BCL-2) que només conté dominis BH3 i que, juntament amb Bcl-6, que inhibeix la proteïna implicada en supervivència B-cell lymphoma-extra large (Bcl-X_L), són inductors de la via intrínseca de l'apoptosi. D'altra banda, FoxO també pot aturar la progressió del cicle cel·lular en la fase G1 regulant a la baixa l'expressió de les ciclines D1 i D2, i a la fase G2/M induint l'expressió de la growth arrest and DNA damage-inducible protein 45α (Gadd45α) i la ciclina G2. També davant d'un estrès oxidatiu indueix l'expressió de la manganesium superòxid

dismutase (MnSOD9), la superoxid dismutase 2 (Sod2) i la catalasa que contribueixen a la detoxificació dels reactive oxygen species (ROS) (Fig.26). Deixant de banda els gens que FoxO pot regular per si sol, també pot regular l'expressió d'un ampli ventall de gens gràcies a la cooperació d'altres factors de transcripció. Entre ells trobem el Runt domain containing transcription factor (RUNX3) que juntament amb FoxO indueixen l'expressió de Bim; les proteïnes SMAD3 i 4, que sota l'estímul del TGF β i en col·laboració amb FoxO indueixen l'expressió de p27, que inhibeix els complexos ciclina-E/cdk2 i ciclina-D/cdk4 i evita així la progressió de la fase G1; aquesta inhibició és antagonitzada al afegir-se FoxG1 al complex SMAD3/4/FoxO (Seoane et al., 2004; Huang and Tindall, 2007; Calnan and Brunet, 2008). Similarment, la β -catenina en complex amb FoxO indueix l'expressió de gens com l'IQGAP2, que es troba implicat en la reorganització del citoesquelet i la desestabilització de les unions cèl·lula-cèl·lula dependents d'E-cadherines; aquest fet promou un augment de la motilitat cel·lular relacionada amb processos de migració i angiogènesi que són importantíssims en processos de metàstasi associats a alguns càncers com el carcinoma de còlon (Tenbaum et al., 2012).

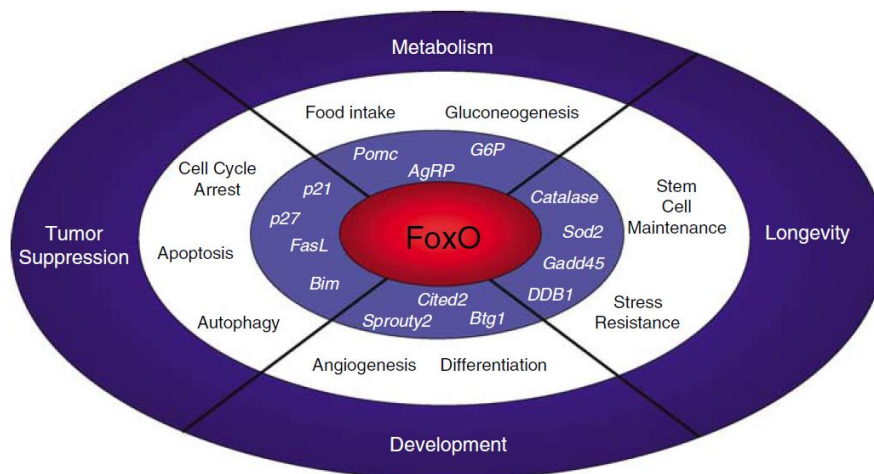


Figura 26. Funció dels gens regulats per FoxO i respostes cel·lular que desencadenen. Imatge obtinguda de (Calnan and Brunet, 2008).

FoxO també regula gens implicats en l'autofàgia. Aquesta resposta cel·lular resulta ser un mecanisme de supervivència que s'activa en processos de manteniment cel·lular a través del *turn-over* de mitocòndries i de diferents òrgans, en l'eliminació de patògens intracel·lulars a través de la inducció de

les respostes innata i adaptativa del sistema immunitari, i en l'eliminació de la inflamació associada a aquestes respostes (Fig.27). De la mateixa manera, quan la cèl·lula es troba en condicions d'estrès, a fi d'escapar de la mort ho fa a través del metabolisme de lípids via lipofàgia intercedida pels *lipid droplets* o mitjançant l'eliminació d'agregats proteics, l'acumulació dels quals podria ser citotòxica, com ara els filaments insolubles de Tau o de α -sinucleïna, característics de malalties com l'Alzheimer o el Parkinson (Choi et al., 2013). Aquest procés es troba regulat pels autophagy related-genes (atg) que coordinen tot el procés de formació de l'autofagosoma fins a l'alliberació del contingut processat. FoxO3 indueix l'expressió d'alguns atg com ara l'LC3b (Map1lc3b), Gabarapl1, Pi3kIII, Ulk2, Atg12l, Beclin1, Atg4b i Bnip3 (Webb and Brunet, 2014).

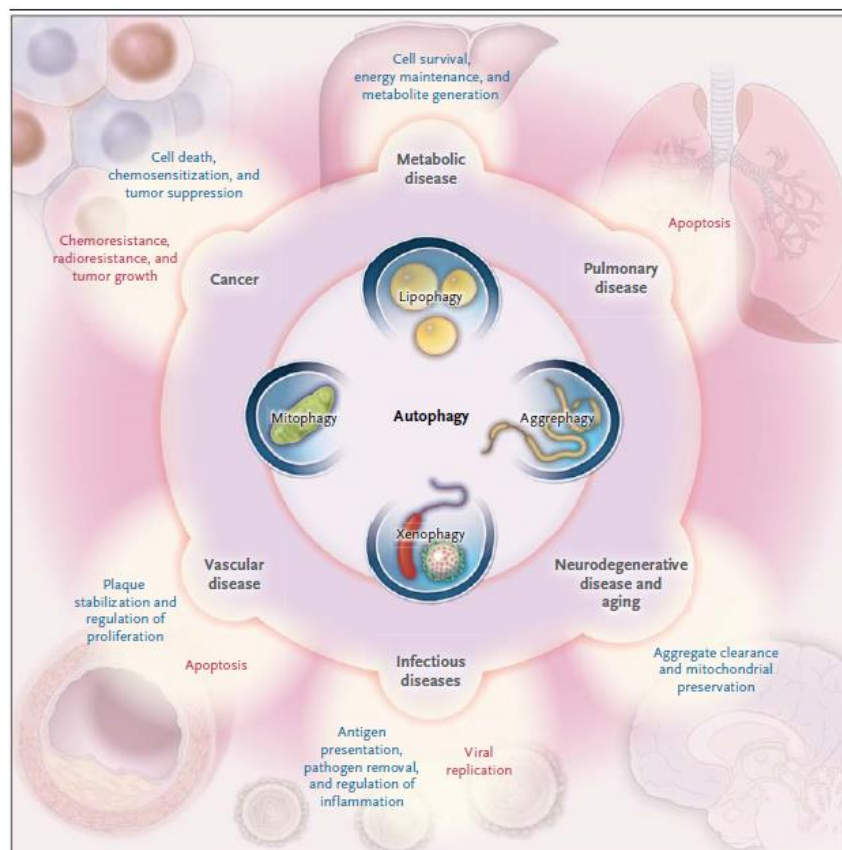


Figura 27. Influència de l'autofàgia en la progressió de diferents malalties. En blau s'indiquen els processos, associats a l'autofàgia, que eviten la progressió de la corresponent malaltia; mentre que en vermell es mostren els processos que afavoreixen la progressió d'aquestes. Imatge obtinguda de (Choi et al., 2013).

L'autofàgia s'inicia amb la formació del fagòfor, on hi participa un complex de proteïnes format per l'unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK), ATG13L i RB1-inducible coiled-coil 1 (Rb1cc1 o FIP200) (Fig.28). Si en el medi hi ha abundància de nutrients, o sota l'estímul d'un factor tròfic, aquest complex trimèric és desestructurat com a conseqüència de la fosforilació d'ULK a la serina 757 per part d'mTORC1; ULK passarà a interaccionar amb la AMPK, que al seu torn mantindrà la hiperfosforilació d'ULK (Kim et al., 2011; Shang et al., 2011). En canvi, en condicions de deprivació tròfica, la via de la PI3K-PKB no és activa i mTORC1 no es pot activar. Per tant l'AMPK, a part d'inhibir mTORC1 a diferents nivells, no podrà interaccionar amb ULK i aquest serà defosforilat iniciant l'autofàgia amb la formació del fagòfor gràcies a la interacció de les proteïnes ATG13L i FIP200 (Fig29.C/D). Posteriorment es constituirà l'autofagosoma, on participa el complex VSP34 format per les proteïnes Beclin-1, ATG14 i la PI3K de classe 3 VSP34, que generarà PI3-P, permetent la crida de proteïnes amb dominis d'interacció a aquest fosfoinosítid, que ajudaran a la nucleació de l'autofagosoma i a la progressió de l'autofàgia.

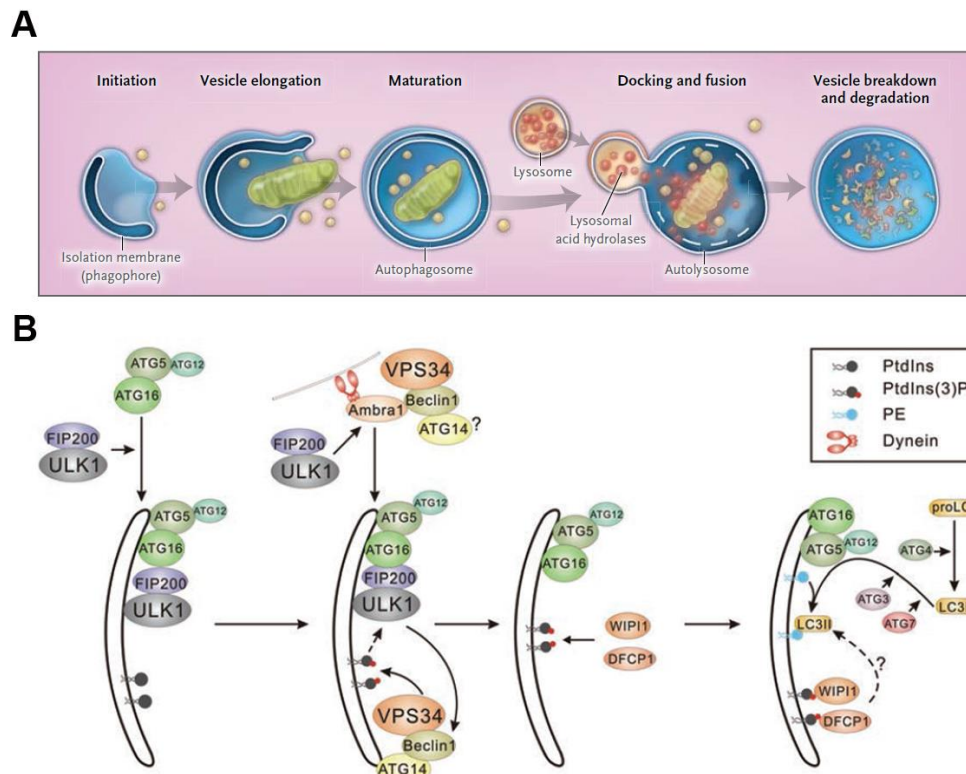


Figura 28. Autòfagia i formació de l'autòfagosoma. (A) Esquema on es representen les diferents fases del procés d'autòfagia. (B) Seqüència on es descriu el procés de formació de l'autòfagosoma i les proteïnes que es troben implicades en aquest. Imatge obtinguda i editada de (Choi et al., 2013; Russell et al., 2014).

En aquestes condicions, FoxO no pot ser retingut al citoplasma per les 14-3-3 ja que són dependents de la fosforilació per PKB, i per tant transloca a nucli a fi d'induir l'expressió de la glutamina sintasa amb la consegüent síntesi de glutamina (Fig.29C). Tant la glutamina de nova síntesi com la que pot ser captada del medi extracel·lular a través del transportador uniport de glutamina solute carrier family 1 (SLC1A5) eviten la formació d'mTORC1, la translocalització al lisosoma, i la seva activació dependent de les diferents GEFs ubicades en aquest compartiment intracel·lular (Fig.29A) (van der Vos et al., 2012; Russell et al., 2014; Webb and Brunet, 2014). La leucina i altres aminoàcids no essencials són els responsables d'activar aquestes GEFs, però ja que a nivell intracel·lular es troba en concentracions baixes, és necessària la seva internalització a través del transportador bidireccional antiport SLCA7/SLC3A2 que acobla la sortida de glutamina amb la entrada d'aminoàcids essencials (EAA) com la leucina (Nicklin et al., 2009a).

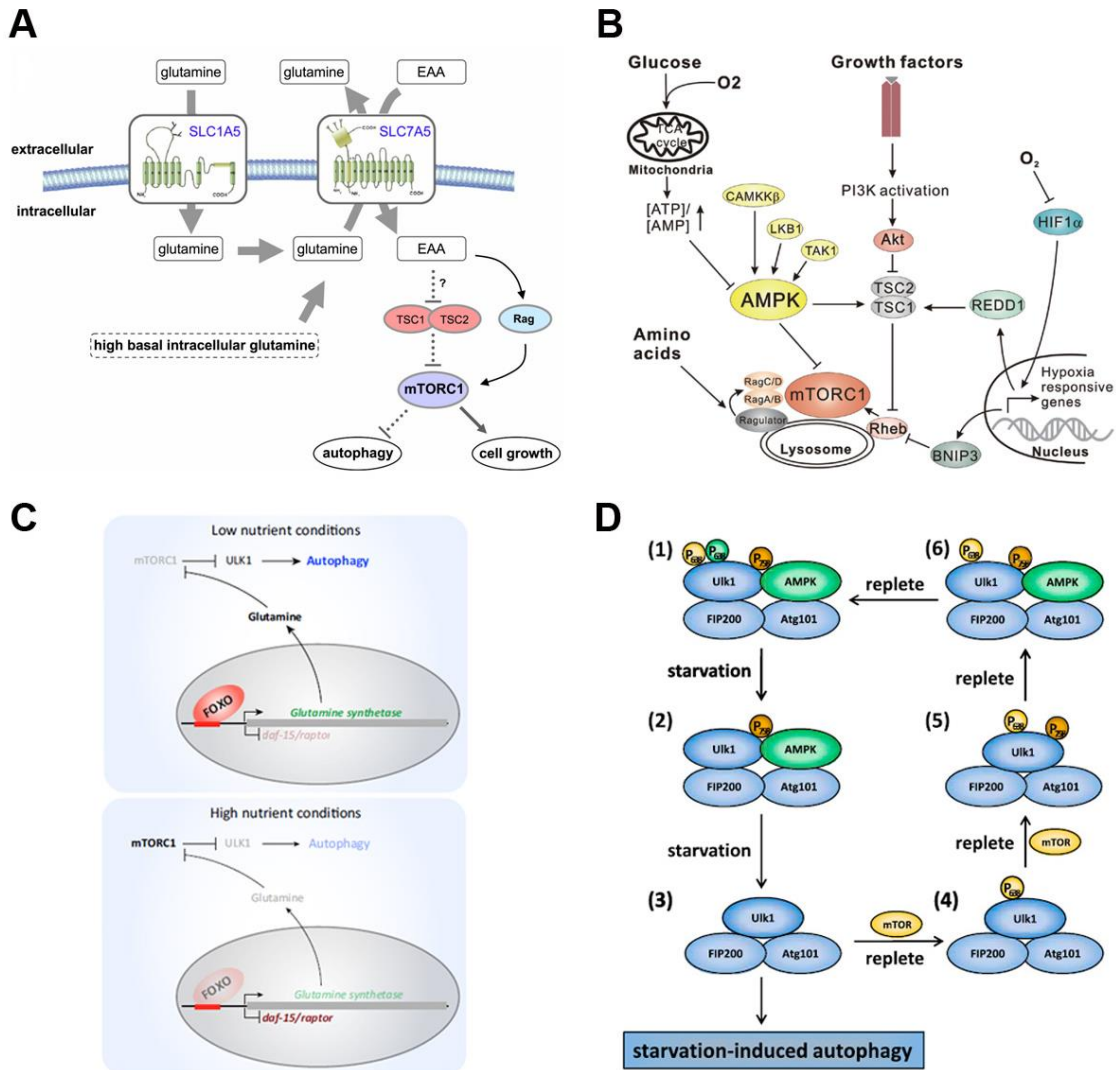


Figura 29. Inducció de l'autòfàgia a través d'mTORC1: importància de la disponibilitat de nutrients i les condicions d'hipòxia cel·lular en l'activació del procés. (A) L-glutamina i el transportador bidireccional antiport SLC7A5/SLC3A2 regulen els processos d'autòfàgia via mTORC1. (B) Interacció antagonista entre FoxO i la via d'mTORC1 en el procés d'autòfàgia marcat per la concentració extracel·lular de nutrients. (C) Esquema on es mostra la inactivació d'mTORC1 dependent d'AMPK i TSC2 en condicions d'hipòxia o dèficit de nutrients. (D) Model d'autòfàgia a través del mecanisme de fosforilació, per part de l'AMPK i d'mTORC1, i defosforilació d'ULK en resposta a nutrients que regula la formació del complex proteic format per l'AMPK, l'Atg101 i la proteïna FIP200. La numeració indica la seqüència del procés. Imatges obtingudes i modificades de (Nicklin et al., 2009b; Shang et al., 2011; Russell et al., 2014; Webb and Brunet, 2014).

L'autòfàgia es troba així finament regulada per la via de la de la PI3K on FoxO, substrat de PKB i SGK, és capaç d'induir l'acumulació d'alts nivells de

glutamina intracel·lular i evita que es formi el complex d'mTORC1 al lisosoma. A més a més FoxO regula negativament l'expressió de raptor, membre indispensable del complex d'mTORC1, i per tant evita la inhibició de l'autofàgia per mTORC1 alhora que afavoreix la formació del complex mTORC2 per l'equilibri dinàmic entre els dos complexos (Jia et al., 2004; Durán et al., 2012; Webb and Brunet, 2014). No obstant això, mTORC1 no només és conegut pel paper que desenvolupa en l'autofàgia, sinó que és un importantíssim sensor metabòlic que regula el creixement i la diferenciació cel·lular principalment a través d'una de les AGC quinases dependent del PIF-pocket de PDK1: la S6K.

3. Creixement i diferenciació cel·lular: mTOR

La proteïna mamalian target of rapamycin (mTOR) és una serina/treonina quinasa atípica de la família de les phosphoinositide 3-kinase-related kinases (PIKKS) que modula diferents respostes cel·lulars, integrant la informació sobre la disponibilitat nutricional i energètica del medi, així com també els diferents estímuls als quals és sensible la PI3K. La quinasa mTOR interacciona amb diferents proteïnes formant dos complexos diferenciats estructuralment i per la seva sensibilitat a la rapamicina: l'mTORC1 i l'mTORC2. Ambdós complexos contenen mTOR, DEP domain containing mTOR-interacting protein (Deptor), mLST8, així com també les proteïnes TELO2 interacting protein 1 (Tti1) i tel2 que ajuden a l'assemblatge i estabilització dels complexos. L' mTORC2 conté, a més a més, la proteïna rictor que juntament amb mSin1 i protor 1/2 contribueixen a la fosforilació del motiu hidrofòbic de SGK i PKB; mentre que mTORC1 incorpora a raptor, el qual deixa d'interaccionar-hi quan la rapamicina s'uneix a la proteïna FKBP12 i reconeixen el domini FRB d'mTOR, desestructurant així específicament el complex 1 d'mTOR i evitant la seva activació (Pearce et al., 2011; Laplante and Sabatini, 2012) (Fig.30).

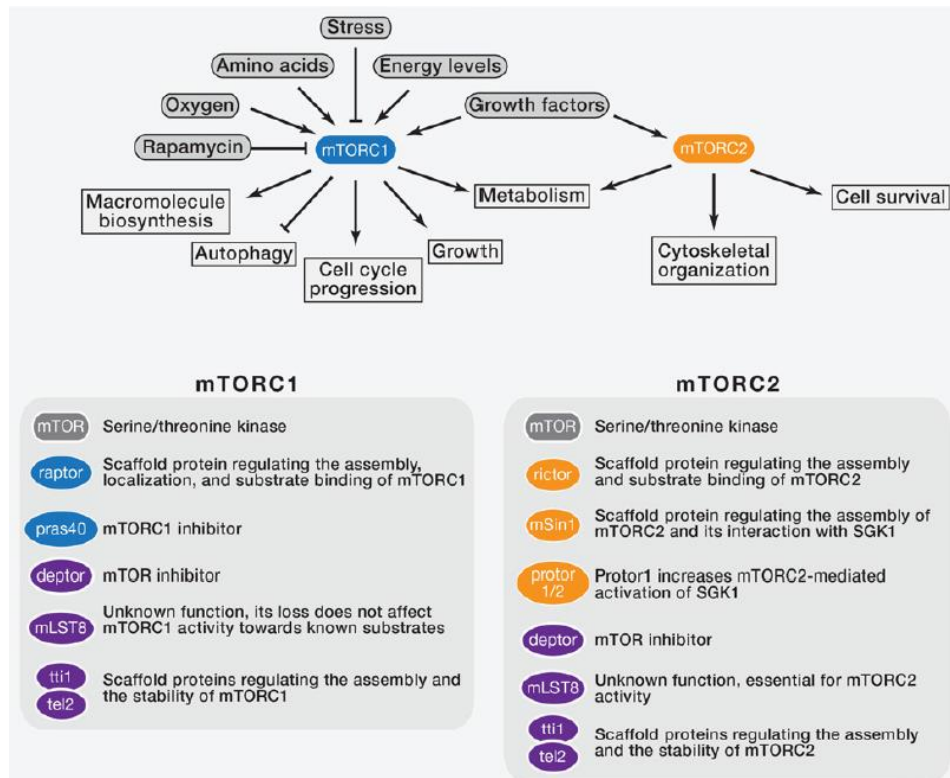


Figura 30. Composició i funcions d'mTORC1 i mTORC2. Esquema representatiu dels diferents estímuls que regulen l'activitat dels dos complexos d'mTOR, així com també les funcions que desenvolupen ja sigui inhibint-les o promovent-les. A la part inferior de la imatge es mostren les diferents proteïnes, tant comunes com específiques, que conformen mTORC1 i mTORC2. Imatge obtinguda i modificada de (Laplante and Sabatini, 2012).

En presència d'un estímul tròfic com el BDNF, l'activació dels receptors Trk i p75, així com també la producció de fosfoinosítids com el PIP3, permeten la dissociació de la GTPasa Rac1 del seu inhibidor RhoGDI. Quan Rac1 és activada ajuda a translocar a la membrana diferents membres de les PIKKs com la PI3K que pot interaccionar, a través del seu extrem C-terminal, amb el colesterol que és abundant en els lípids rafts. Per tant, sota estímul tròfic, Rac1 contribueix a l'activació de la PI3K a la membrana plasmàtica, mTORC2 al reticle endoplasmàtic i mTORC1 a la membrana lisosomal o d'endosomes (DerMardirossian and Bokoch, 2005; Xu et al., 2010; Boulbés et al., 2011; Saci et al., 2011). Un cop al lisosoma, mTORC1 és activat directament per la GTPasa Rheb, i d'una forma dependent d'aminoàcids per un complex heterodimèric que interacciona amb raptor i és actiu quan les GTPases RagA/B es troben unides a GTP i RagC/D a GDP. Les Rag GTPases formen

heterodímers i es localitzen i són activades a la membrana lisosomal gràcies al complex proteic Ragulator, que actua com a GEF de les Rag A/B i les ancora a la membrana com a conseqüència de l'habilitat d'alguns dels seus components per interaccionar amb certs tipus de lípids (Sancak et al., 2010). Dues de les proteïnes de Ragulator , la p18 i la p14, interaccionen i transmeten el canvi conformacional de la v-ATPasa en resposta a la hidròlisi d'ATP induïda per l'acumulació d'aminoàcids a nivell lisosomal, que permet el transport d'aquests aminoàcids dins del lisosoma associat al gradient de protons generat (Fig.31). D'altra banda, en presència d'aminoàcids, la Leucil-tRNA syntethasa (LeuRS) transloca a la membrana lisosomal on, d'una forma dependent d'ATP i de leucina, actua com a GAP de les Rag C/D, promovent l'activació d'mTORC1 (Huang et al., 2008; Sancak et al., 2008; Zoncu et al., 2011a; Han et al., 2012).

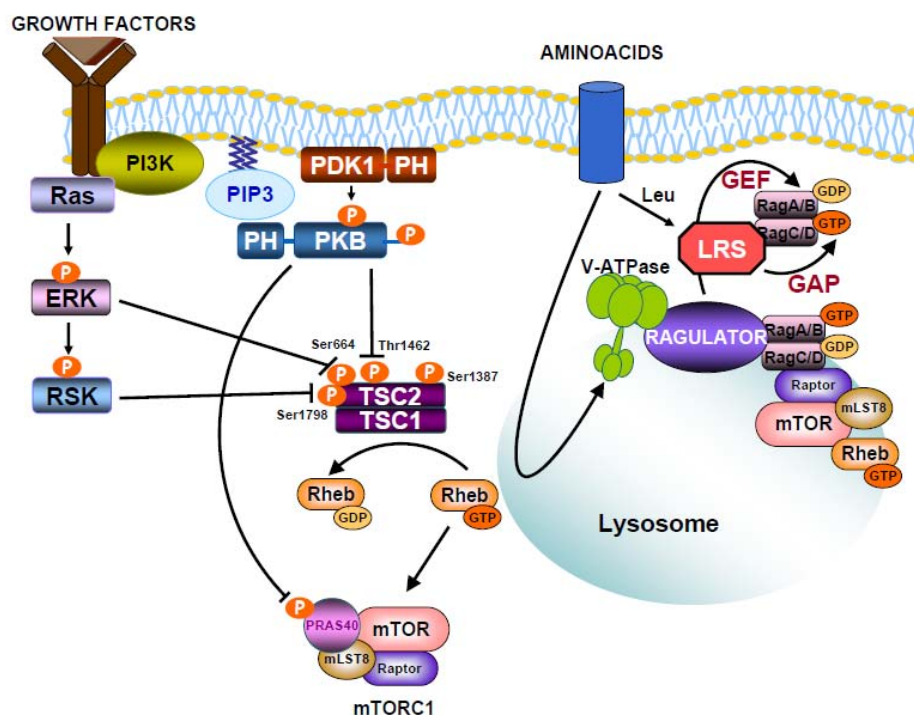


Figura 31. Via de senyalització d'mTORC1 i procés d'activació del complex al lisosoma dependent d'aminoàcids. Imatge cedida pel Dr. José Ramón Bayascas Ramírez.

El complex 1 d'mTOR es troba implicat en processos tan essencials que el *knockout* (KO) d'mTOR resulta incompatible amb la viabilitat cel·lular essent letal embrionari a nivell postimplantacional (Gangloff et al., 2004) i la seva

desregulació es troba associada a malalties neurodegeneratives, trastorns metabòlics i càncer. Un cas similar passa amb el KO de raptor i també amb el de rictor, tot i que els ratolins deficients en l'expressió de rictor tinguin una esperança de vida més llarga que els dos models murins anteriors (Guertin et al., 2006). Dels dos complexos, mTORC2 és activat en cèl·lules en creixement al interaccionar amb els ribosomes d'una forma dependent de la via de la PI3K i d'aminoàcids i intercedeix en respostes de supervivència i viabilitat cel·lular mitjançant l'activació de PKB, SGK i algunes PKC. El complex mTORC2 també regula la mida cel·lular exclusivament a nivell de sistema nerviós central via PKB i de forma independent a mTORC1 (Easton et al., 2005; Guertin et al., 2006; Gan et al., 2011; Tato et al., 2011; Thomanetz et al., 2013). D'altra banda, mTORC1 s'encarrega del control del creixement i mida cel·lular a través de l'activació de substrats com S6K i 4EBP1 (Fig.32), que desenvolupen un paper importantíssim en la síntesi proteica i participen en el complex iniciador de la traducció (Dennis et al., 2012; Magnuson et al., 2012).

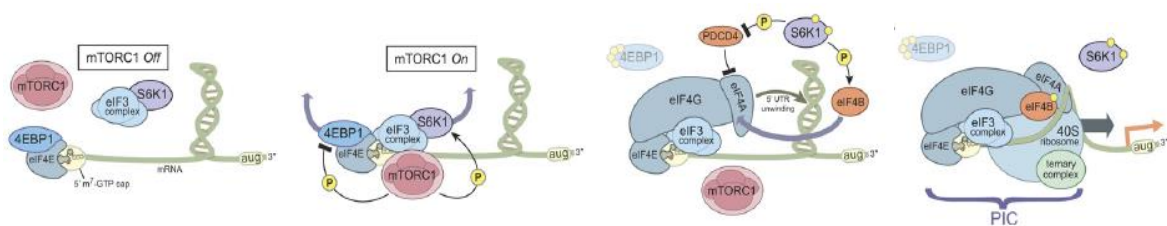


Figura 32. Model on es mostra el procés de formació del preiniciació complex (PIC), format per diferents proteïnes i regulat principalment per S6K i 4EBP1, que permetrà la iniciació de la síntesi proteica dependent d'mTORC1. Imatges obtingudes i modificades de (Magnuson et al., 2012).

Al sistema nerviós central, S6K participa en processos de creació i consolidació sinàptica així com també en la traducció axonal asimètrica d'mRNAs (Fig.33), a fi d'actuar de forma ràpida davant les necessitats neuronals en resposta a senyals extracel·lulars sense haver de passar pel nucli (Cheng et al., 2011a; Jung et al., 2012).

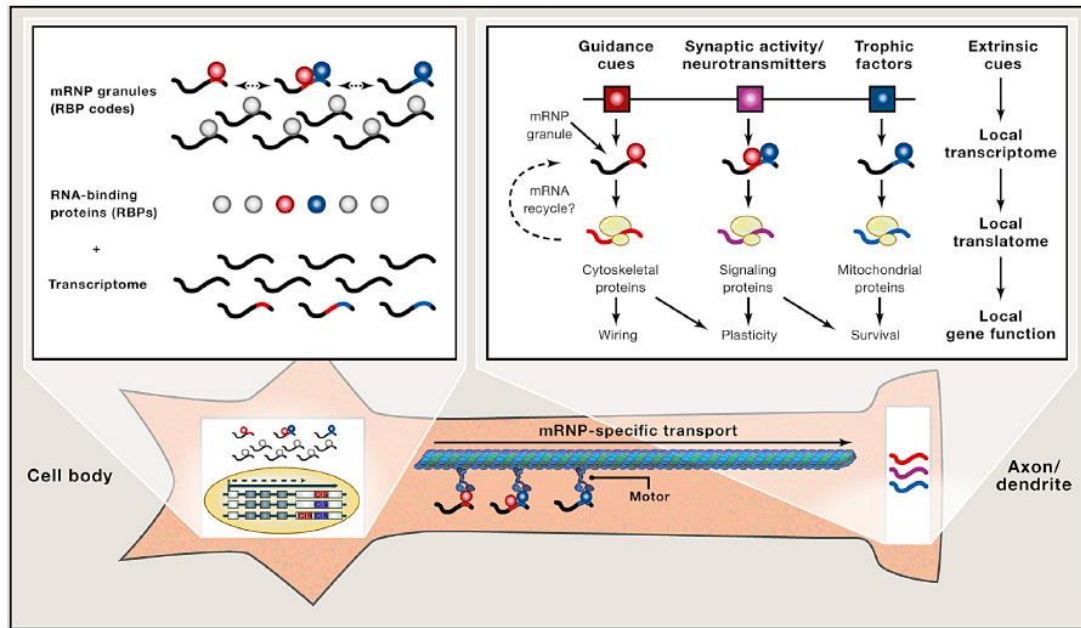


Figura 33. Expressió gènica localitzada a través del control de la traducció localitzada d'mRNAs. En l'esquema es descriu la transcripció d'mRNA nuclear, el conseqüent transport axonal, dependent de les ribonucleoproteïnes, del transcriptoma i la síntesi proteica regulada específicament pels diferents estímuls extracel·lulars. Imatge obtinguda de (Jung et al., 2014).

La rellevància funcional d'mTORC1 implica el requeriment de mecanismes i sensors molt fins que regulin l'activitat d'aquesta quinasa. Aquests sistemes actuen en situacions extremes de manca d'oxigen o nutrients inhibint mTORC1 i les respostes de creixement cel·lular associades per tal de prioritzar les de supervivència. Entre aquests sistemes de regulació trobem el complex TSC1/TSC2, que inhibeix la GEF d'mTORC1; PRAS40, que interacciona amb mTORC1 a fi d'evitar que fosforili els seus substrats; i l'AMPK, que evita que raptor interaccioni amb el complex al ser fosforilat i segregat per proteïnes 14-3-3, a la vegada que indueix l'activació de TSC1/2 (Kwiatkowski and Manning, 2005; Sancak et al., 2007; Gwinn et al., 2008). Per la seva banda la hipòxia indueix l'expressió de l'hipoxia induced factor (HIF) que regula gens de resposta a hipòxia com l'RTP801/REDD1, que al seu torn inhibeixen les respostes de creixement cel·lular a través, altra cop, de l'activació del complex TSC1/2 (Shoshani et al., 2002; Brugarolas et al., 2004). Augments en els nivells de la proteïna REDD1 i la conseqüent inhibició de la via d'mTORC1 d'una forma TSC1/2 dependent, es troben associats tan a malalties neurodegeneratives com el Parkinson com a trastorns psiquiàtrics com la

depressió major (Malagelada et al., 2006, 2008; Dazert and Hall, 2011; Ota et al., 2014). De forma totalment antagònica a les situacions prèvies, la inhibició parcial o el manteniment d'una activitat baixa d'mTORC1 promou un increment de l'esperança de vida al reduir els efectes secundaris de la intenses respostes cel·lulars associades al complex, així com també pot frenar la progressió d'algunes malalties neurodegeneratives (Malagelada et al., 2010; Zoncu et al., 2011b).

D'altra banda, tant la via de la PI3K/PDK1/PKB com la via de la MAPK/RSK associades a supervivència cel·lular, s'encarreguen d'inhibir per fosforilació el complex TSC1/2 i PRAS40 per alliberar a mTORC1 a fi que finalitzi les respostes metabòliques, estructurals i de plasticitat iniciades pels estímuls tròfics extracel·lulars (Roux et al., 2004; Vander Haar et al., 2007; Urbanska et al., 2012) (Fig.34).

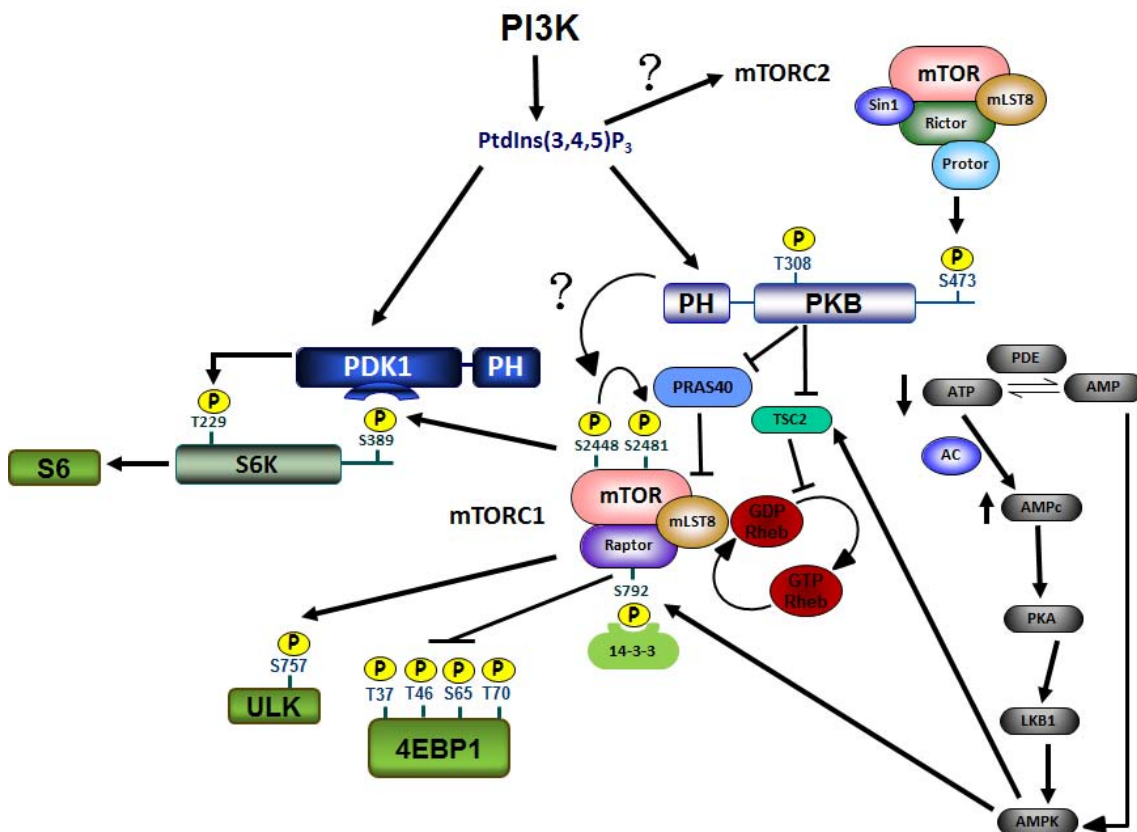


Figura 34. La via PI3K/PDK1/PKB i l'AMPK són els sensors que regulen diferencialment l'activació d'mTORC1 a través de PRAS40 i TSC2.

4. Desenvolupament neuronal

El desenvolupament neuronal engloba tots aquells canvis morfològics que pateixen les neurones postmitòtiques en resposta als diferents estímuls extracel·lulars. Aquests canvis els ajudaran a integrar-se en les seves respectives localitzacions del cervell a través dels diversos processos migratoris que tenen lloc durant les diferents etapes del desenvolupament embrionari, i participaran en la consolidació estructural i funcional dels diferents circuits neuronals postnatsals.

Aquest procés es pot simplificar principalment en 5 etapes observables en cultius primaris de neurones corticals o hipocampals durant els diferents dies de cultiu in vitro (DIV). La primera etapa es dona durant les primeres 6 hores del DIV0 i es caracteritza per una població de neurones amb lamelipodies i filopodies que presenten una simetria esfèrica; durant la segona etapa inclosa entre les 6-12 hores del DIV0 es formen i creixen les neurites; en la tercera etapa compresa entre el DIV2 i el DIV4 es dona la polarització neuronal, que inclou la diferenciació axo-dendrítica i el creixement axonal, mentre que l'elongació dendrítica forma part de la quarta etapa corresponent a l'interval entre els DIV4 i 7. A partir del DIV7 i dins la cinquena etapa continuen els processos d'arborització dendrítica i ramificació axonal, juntament amb la formació de les espines dendrítiques, acabant amb la sinaptogènesi com a procés de connexió i comunicació de les neurones madures, i la plasticitat implícita en ella (Dotti et al., 1988) (Fig.35).

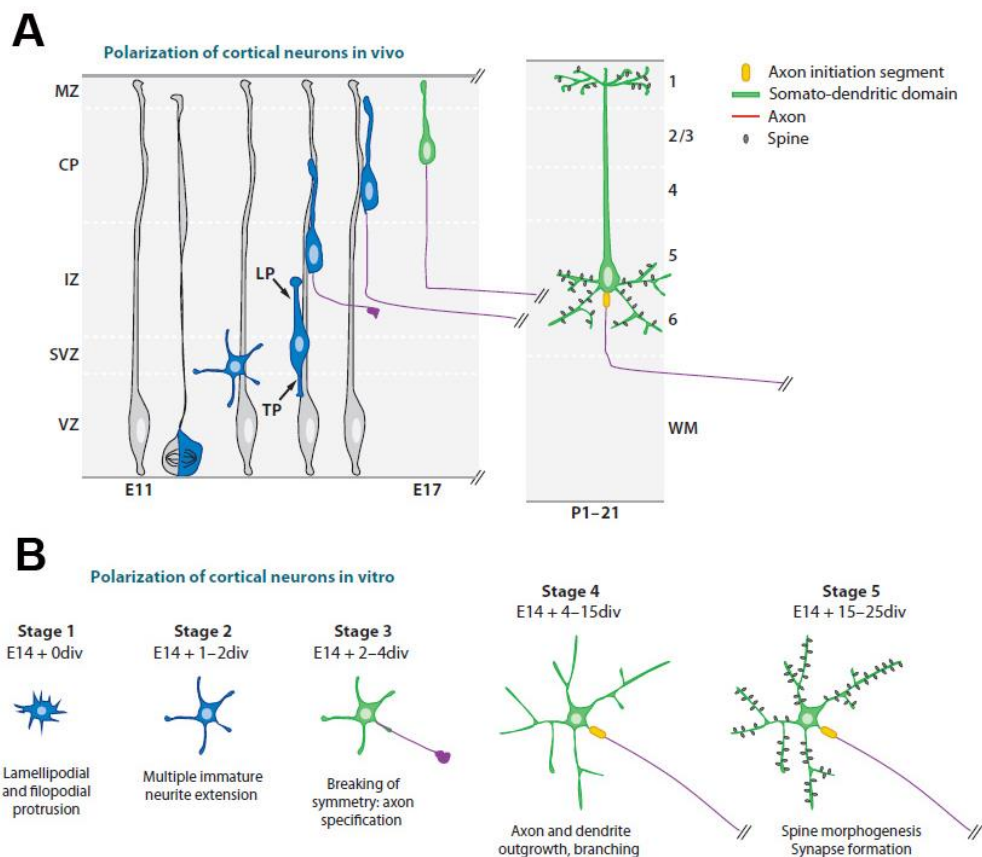


Figura 35. Polarització neuronal. (A) Imatge on es representa el procés de polarització neuronal *in vivo* de les neurones corticals al llarg de les diferents capes del còrtex. (B) Imatge on es representa el procés de polarització de les neurones corticals *in vitro*. Es referencien els diferents estadis de diferenciació i l'equivalència en DIV, així com també els fenotips neuronals que apareixen en cada estadi. Imatge obtinguda i editada de (Barnes and Polleux, 2009)

4.1 Neuritogènesi

La neurona postmitòtica presenta una simetria esfèrica la qual és alterada per diferents senyals intrínsecs o extrínsecs. Aquests estímuls extrínsecs engloben tan components de la matriu extracel·lular incloent la laminina, la tenascina, la col·làgena o l'àcid hialurònic, com molècules solubles representades pels fibroblast growth factors (FGF), el transformin growth factor (TGF- β), el vascular endothelial-cell growth factor (VEGF), l'insulin growth factor (IGF), així com diferents neurotrofines. Tots ells indueixen una reorganització dels filaments d'actina generant protusions en la neurona com ara les lamelipòdies que s'associen a funcions migratòries o les filopodies que actuen com a sensor transmetent aquests canvis extracel·lulars a nivell intracel·lular (da Silva and

Dotti, 2002) (Fig.36A). Els components de la matriu extracel·lular interaccionen amb receptors de membrana associats a molècules d'adhesió cel·lular com les integrines o les cell adhesion molecule (CAM), creant microdominis amb una elevada densitat d'aquests receptors. Aquests activaran canals de Ca^{2+} , comportant un augment del Ca^{2+} intracel·lular i d'AMP cíclic amb la conseqüent activació de les CAMK, la CaM i la PKA (Gomez et al., 2001; Spitzer, 2002); mentre que neurotrofines com l'NGF o el BDNF interaccionen amb receptors Trk induint l'activació de la via de la MAPK i la PI3K (Labelle and Leclerc, 2000). Aquests senyals intrínsecs es tradueixen en una desestabilització dels filaments d'actina regulada per canvis d'activitat en les Rho GTPases, concretament per una inactivació de la proteïna ras homolog gene family, member A (Rhoa) i el seu substrat rho-associated coiled-coil-containing protein kinase (ROCK), i una activació de Ras i RhoG que activaran al seu torn les Rho GTPases cell division cycle 2 (Cdc42) i RAS-related C3 botulinum substrate 1 (Rac1). Els anteriors fets es tradueixen en un augment del volum de la membrana plasmàtica a través del transport i fusió d'endosomes amb aquests microdominis de membrana (Fig.36B). L'activació d'aquestes Rho GTPases també es troba implicat en el dinamisme dels filaments d'actina i la polimerització dels microtúbuls, donant lloc a la formació de les neurites, la seva elongació fins a 15 μm i el seu dinamisme expressat amb la seva capacitat d'extensió i de retracció (Da Silva et al., 2003; Santos Da Silva et al., 2004; Govek et al., 2005) (Fig.36C).

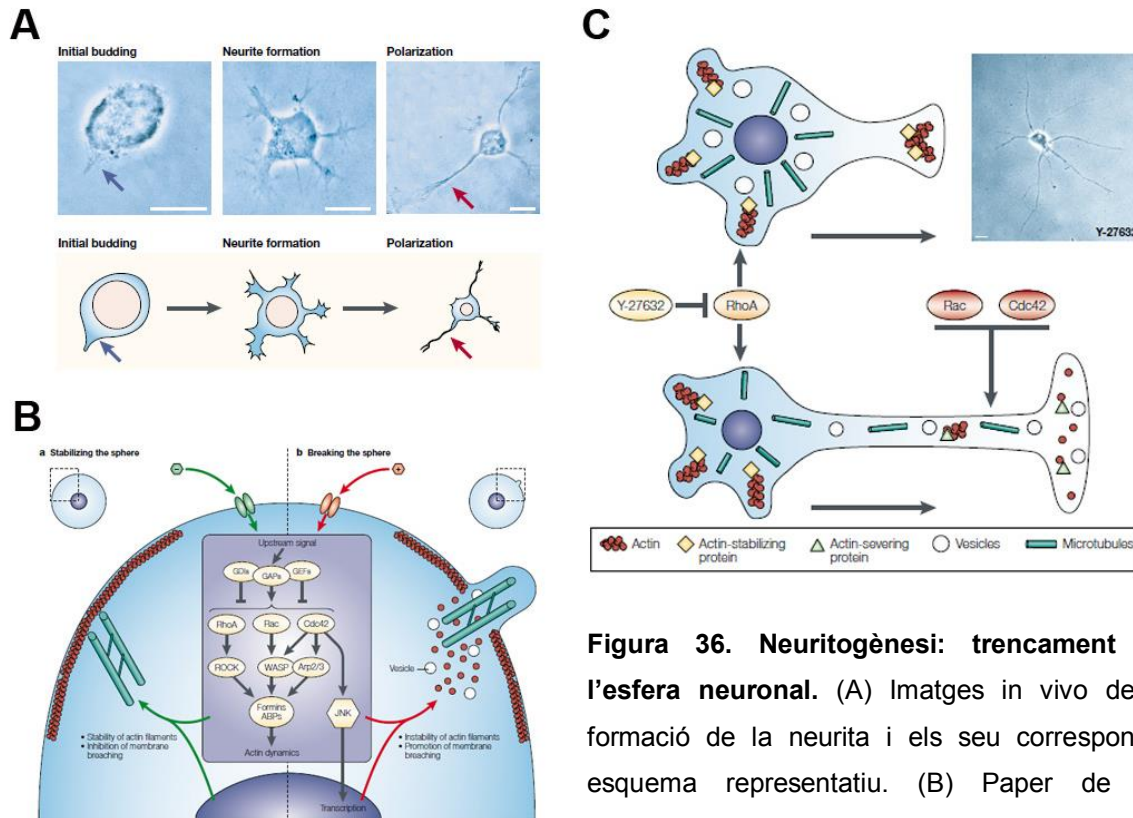


Figura 36. Neuritogènesi: trencament de l'esfera neuronal. (A) Imatges in vivo de la formació de la neurita i els seu corresponent esquema representatiu. (B) Paper de les proteïnes associades a l'actina en la formació i

extensió de la neurita. (C) Imatge representativa on s'observa el paper de RhoA i de Rac/Cdc42 en els processos de neuritogènesi i axonogènesi. El compost Y-27632 és un inhibidor de RhoA i provoca la formació de múltiples processos neurítics observables en la imatge in vitro de la neurona cortical. Imatges obtingudes i modificades de (da Silva and Dotti, 2002).

4.2 Polarització

Hi ha un gran ventall de senyals extracel·lulars que es troben implicades en els processos de diferenciació, d'atracció i de retracció axonal. És el cas de les netrines, les semaforines, les slit i les efrines, que regulen a nivell intracel·lular l'activació de diferents GTPases; així com també hi ha implicades diferents neurotrofines com l'NGF i el BDNF o proteïnes secretades com la de Wnt (Labelle and Leclerc, 2000; Govek et al., 2005; Hilliard and Bargmann, 2006). Aquest gradient d'estímuls extracel·lulars activen el corresponents receptors que indueixen un augment de l'activitat de Ras i de la PI3K i comporten un increment de PIP3 a la membrana, procés que és revertit per la fosfatasa PTEN tot impedit l'axonogènesi (Ménager et al., 2004). L'augment d'aquest segon

missatger promou, a través de la Rab1b, l'activació de la GTPasa Cdc42. Aquesta GTPasa interacciona amb el complex format per PAR6, PAR3 i les PKC atípiques; complex que al seu torn activa la Rho GTPasa Rac1, implicada en un feedback positiu sobre la via de la PI3K (Schwamborn and Püschel, 2004; Arimura, Nariko and Kaibuchi, 2007) (Fig.37).

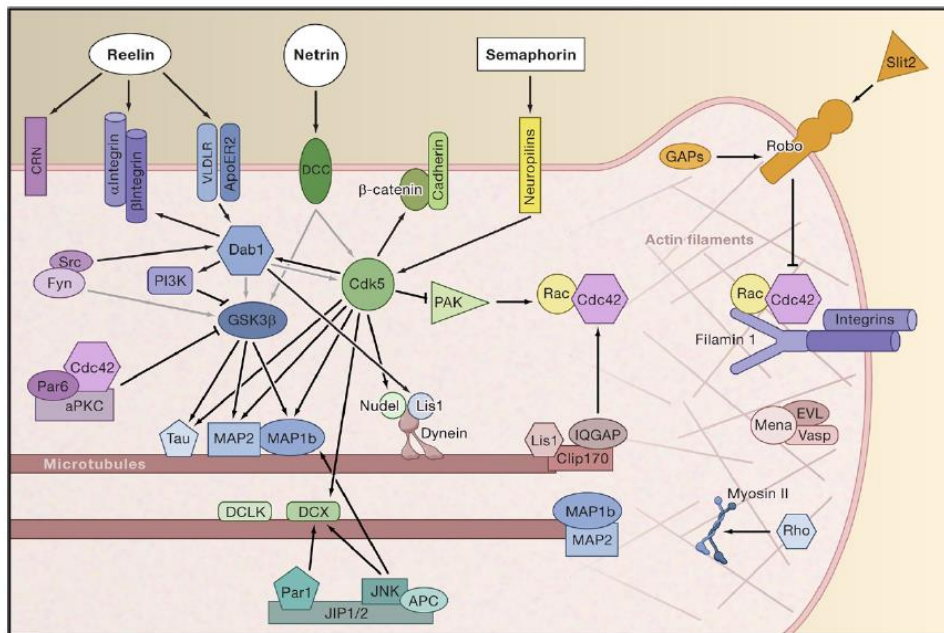


Figura 37. Entramat de vies de senyalització que regulen la polarització i a la vegada la migració neuronal. Imatge obtinguda de (Ayala et al., 2007).

La diferenciació de la neurita a axó i la seva conseqüent elongació es dona per un trencament de l'equilibri dinàmic entre els filaments d'actina i els microtúbuls: els filaments d'actina es desestabilitzen a través de la inhibició de RhoA, i els microtúbuls polimeritzen com a conseqüència de la inhibició de la proteïna MARK2 i de GSK3, evitant-se així la fosforilació de les proteïnes Tau, MAP2 i CRMP2 que s'associa a la desestabilització dels microtúbuls (Hur and Zhou, 2010) (Fig.38A). D'altra banda, la diferenciació axonal ve donada per fenòmens de degradació proteosomal on en totes les neurites no polaritzades es dona una ubiquitinació, per part les les ubiquitin lligases SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 (smurf1) i smurf2, i degradació de la proteïna BRSK1 i de la proteïna PAR6, evitant la formació del complex PAR3/PAR6/PKCα (Fig.38B).

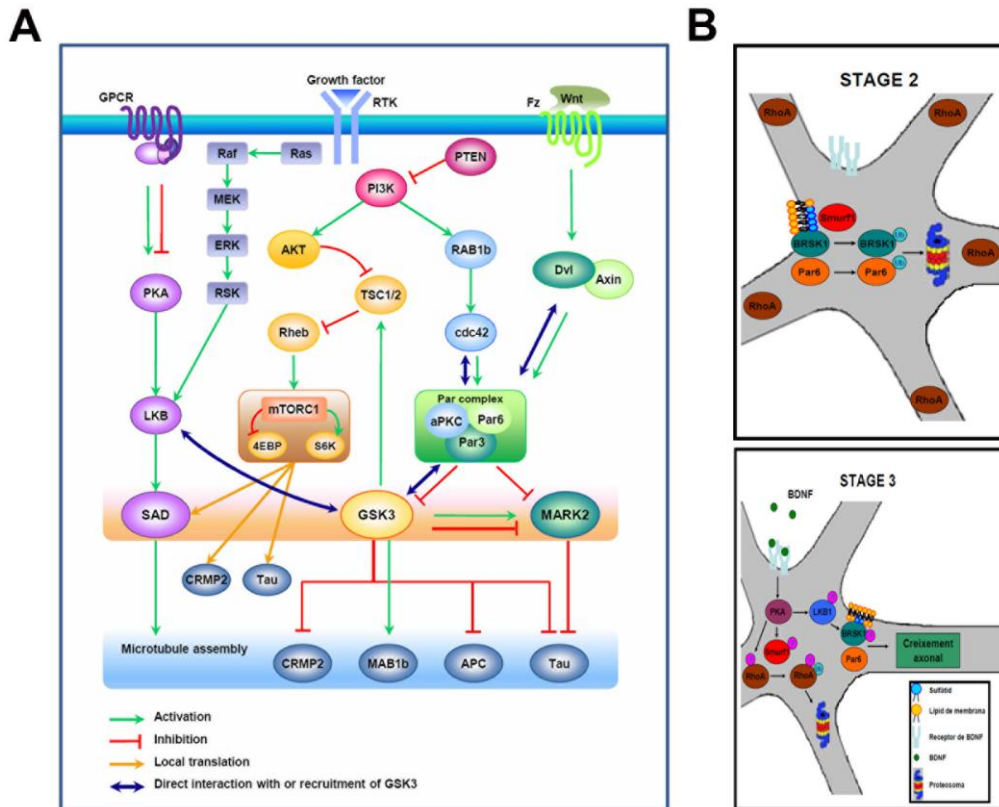


Figura 38. Vies de senyalització implicades en l'axonogènesi. (A) Paper de la GSK3 en la polarització neuronal. (B) Model de polarització axonal induït per l'activació de PKA en resposta al BDNF. Imatges obtingudes de (Hur and Zhou, 2010; Ruiz Babot, 2013).

De forma anàloga, en la neurita que esdevindrà axó es dona un augment del Ca^{2+} intracel·lular que promou l'activació de la PKA. Aquesta quinasa fosforilarà al seu substrat smurf1, tot provocant-li un canvi d'especificitat, ja que passa d'afavorir la ubiquitinació i degradació de PAR6 a la de RhoA, permetent així la formació del complex par-3 family cell polarity regulator (PAR3)/PAR6/PKCα específicament en el con de creixement de l'axó en fase d'elongació i no en les neurites indiferenciades (Shi et al., 2003; Wang et al., 2003; Cheng et al., 2011b). També evitarà la degradació de la brain-specific serine/threonine kinase 1 (BRSK1), preservant així les respostes d'aquesta quinasa que es troben associades a l'orientació del centrosoma, la nucleació i l'estabilització dels microtúbuls a través de la regulació de la fosforilació de microtubule-associated protein 2 (Map2) i Tau (Ebner et al., 1999; Kishi et al., 2005).

L'expressió i activació per fosforilació de les BRSK està íntimament relacionada amb la via de la MAPK i la PI3K-PDK1, on l'activació de la BRSK1 i la BRSK2 és dependent de la quinasa LKB1, la qual és fosforilada en la serina 431 tant per la RSK, la PKA com per la PKC atípica PKC ζ (Lizcano et al., 2004; Xie et al., 2008). La proteïna LKB1 inactiva es distribueix de forma homogènia per tota la neurona i és activada, en complex amb les proteïnes STE20-related kinase adaptor (STRAD) i mouse protein-25 (MO25), en resposta a augments localitzats de Ca²⁺ intracel·lular dependents de neurotrofines com el BDNF. Aquests augments de calci promouen la localització de l'LKB1 a la neurita que esdevindrà axó i al llarg de l'axó en creixement, associada amb totes les altres proteïnes implicades en la diferenciació axonal que hem vist anteriorment (Shelly et al., 2007; Winckler, 2007; Barnes et al., 2008). De forma anàloga, l'expressió axonal de les BRSKs i d'altres proteïnes implicades en la dinàmica dels microtúbuls, com Tau o phospho-mimetic collapsin response mediator protein 2 (CMRP2), depèn d'mTORC1 i dels seu substrat S6K que, com hem vist anteriorment, es troben regulats per la via de la PI3K-PDK1-PKB. Aquesta via és activada en la neurita que es diferenciarà a axó i participa en la traducció local de proteïnes imprescindibles per l'elongació axonal (Shi et al., 2003; Morita and Sobue, 2009; Zurashvili et al., 2013).

4.3 Sinaptogènesi

L'elongació de l'axó finalitza quan aquest arriba a la corresponent regió cerebral, on s'inicia la cinquena etapa del desenvolupament neuronal descrita en el model d'*Arimura i Cabiuchi 2007*. Aquesta etapa inclou la formació de sinapsis i principalment es basa en la interacció de l'axó amb la cèl·lula diana, establint una sinapsis primerenca d'etiologia química, que pot estabilitzar-se i madurar o desestabilitzar-se i perdre's. En les etapes inicials de la sinaptogènesi neuronal axo-dendrítica es formen filopodies a les dendrites que presenten un elevat dinamisme dels filaments d'actina, semblant al de les neurites en resposta de les molècules senyalitzadores extracel·lulars, a fi de contactar amb els axons pròxims i establir una sinapsis. Diferents receptors, com els Trk a través de la via de la PI3K, els receptors d'efrines o les cadherines via Rho GTPases, i la família de les proteïnes WNT; es troben

implicats en el dinamisme d'aquestes filopodies, però sobretot en la maduració d'aquestes sinapsis a través d'una remodelació estructural i funcional de la filopodia per esdevenir una sinapsis madura en forma d'espina dendrítica (Salinas and Price, 2005; Moeller et al., 2006; Kayser et al., 2008; Zhang et al., 2009; Ciani et al., 2011; Park and Poo, 2013) (Fig.39A).

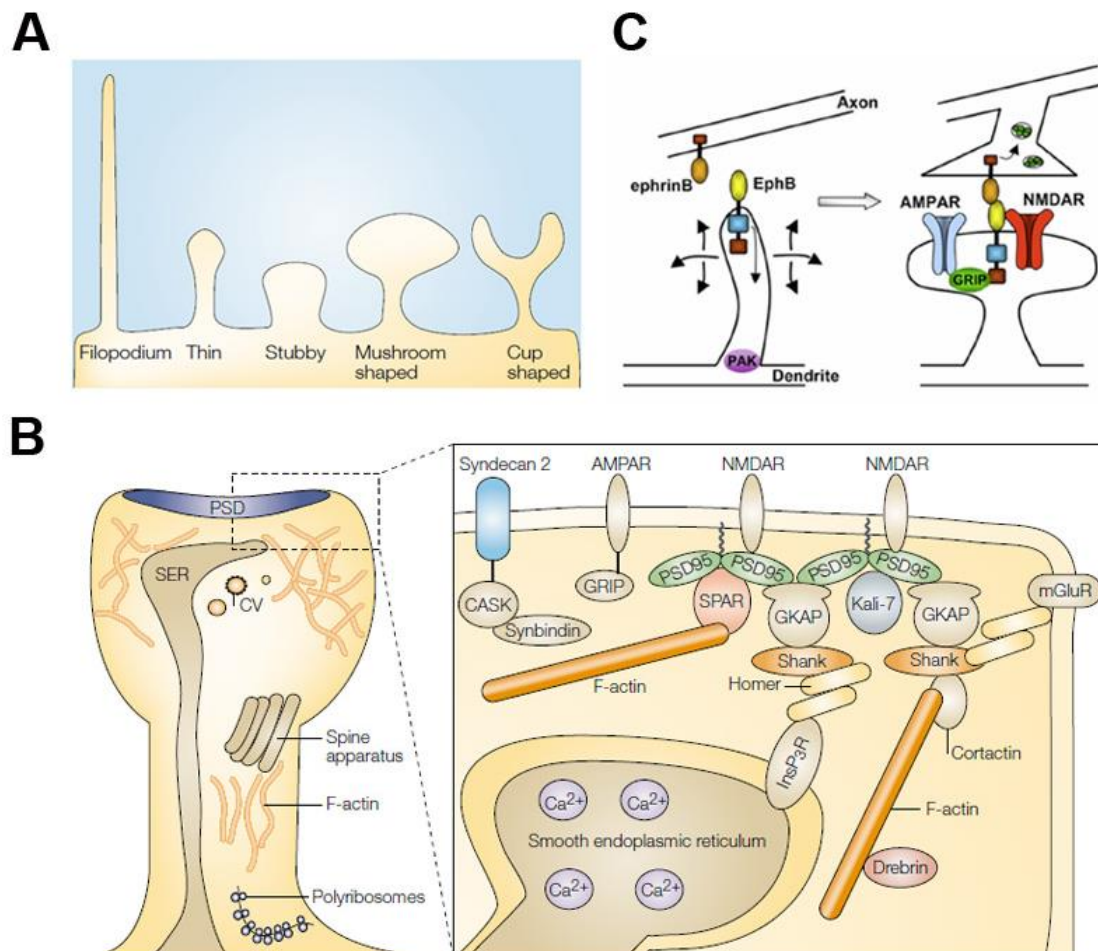


Figura 39. Vies de senyalització implicades en l'axonogènesi. (A) Classificació morfològica de les espines dendrítiques. (B) Estructura de l'espina dendrítica. L'smooth endoplasmic reticulum (SER) es troba en algun tipus d'espines dendrítiques, pròxim a la membrana sinàptica i a les proteïnes d'ancoratge que interaccionen amb la post synaptic density (PSD); d'aquesta manera actua com a reservori de Ca^{2+} per alliberar aquest segon missatger en resposta de l'estímul extracel·lular i per tant activar la via de senyalització corresponent. (C) Model de sinaptogènesis dependent d'EphrB. Un cop s'estableix una unió axonal estable ephrinB/EphB, és quan es dona la diferenciació de la terminal presinàptica, el reclutament de receptors NMDA i AMPA a nivell postinàptic i la conseqüent formació de l'espina dendrítica. Imatges obtingudes de (Kim and Sheng, 2004; Kayser et al., 2008).

Aquest procés consisteix en un canvi estructural en els filaments d'actina, que es retrauen i es ramifiquen d'una forma dependent de les Rho GTPases; i en una habilitació funcional de l'espina, basada en el reclutament de diferents receptors d'AMPA i d'NMDA (Fig.39C). Aquests receptors s'estabilitzen a la membrana de la futura espina per diferents proteïnes amb dominis PDZ com la PSD95 (Fig.39B), que s'hi localitza en augments de Ca^{2+} intracel·lular d'una forma CAMKII dependent, definint així la naturalesa inhibidora o excitatòria de la sinapsis (Kim and Sheng, 2004; Cline, 2005).

5. Mouse Neocortex

Les regions cerebrals del còrtex i l'hipocamp es formen en etapes primerenques dels desenvolupament cerebral i es troben ubicades en la regió posterior del cervell en desenvolupament anomenada telencèfal. A diferència d'altres regions implicades en processos de formació i consolidació de memòria com l'estriat, aquestes tenen un origen comú en la regió del pallium del telencèfal i el seu desenvolupament és previ als processos de migració neuronal.

5.1 Migració neuronal

La migració neuronal consisteix en el desplaçament de les neurones postmitòtiques a les seves regions de destí, i ho fan gràcies als diferents canvis morfològics que pateixen durant el desenvolupament neuronal en resposta als diferents estímuls extracel·lulars descrits anteriorment. El còrtex d'un adult està format principalment per neurones glutamatèrgiques excitatòries i per interneurons gabaèrgiques que inhibeixen les anteriors a través de la secreció del neurotransmissor GABA. Aquest juntament amb la glicina provoquen una hiperpolarització de la membrana postsinàptica associada a l'obertura de canals aniònics de Cl^- que redueix l'eficiència dels *inputs* excitatòris (Fishell and Rudy, 2011). Tot i l'estreta relació que presenten, aquests dos tipus neuronals difereixen en la localització dels seus respectius precursors neuronals encara que comparteixin les mateixes regions de destí. Això deixa entreveure dos tipus de migració diferents en funció del tipus neuronal: la migració radial i la migració tangencial.

5.1.1 Migració Radial i Corticogènesi

En la migració radial els precursors de les neurones glutamatèrgiques o piramidals es troben en la zona ventricular (VZ), regió ubicada a la regió del pallium del telencèfal que es disposa radialment al tub neural i que és per on les neurones migren de forma perpendicular, direccionant-se a la capa més interna de les meninges, la piamater.

En la zona ventricular, els precursors neuronals d'origen epitelial o també coneguts com a glia radial (RGC) pateixen una divisió asimètrica generant més glia radial, neurones postmitòtiques o cèl·lules precursoras intermèdies (IPC); les quals es dividiran de forma simètrica a la zona subventricular, adjacent a la VZ, per donar lloc a les futures neurones. La glia radial té el seu nucli en la VZ des d'on projecta un únic procés a la piamàter creant així una bastida per les neurones piramidals. Aquestes interaccionen amb la glia radial físicament a través de les diferents molècules d'adhesió cel·lular i químicament amb diverses molècules guia a fi de desplaçar-se per processos de nucleoquinesis fins a la seva corresponent destinació (Fig.40). Un cop totes les neurones postmitòtiques han assolit la seva destinació donant lloc a les diferents capes corticals, la glia radial retraurà els seus processos i es diferenciarà a astròcits (Rakic, 1972; Marín and Rubenstein, 2003; Kriegstein and Noctor, 2004).

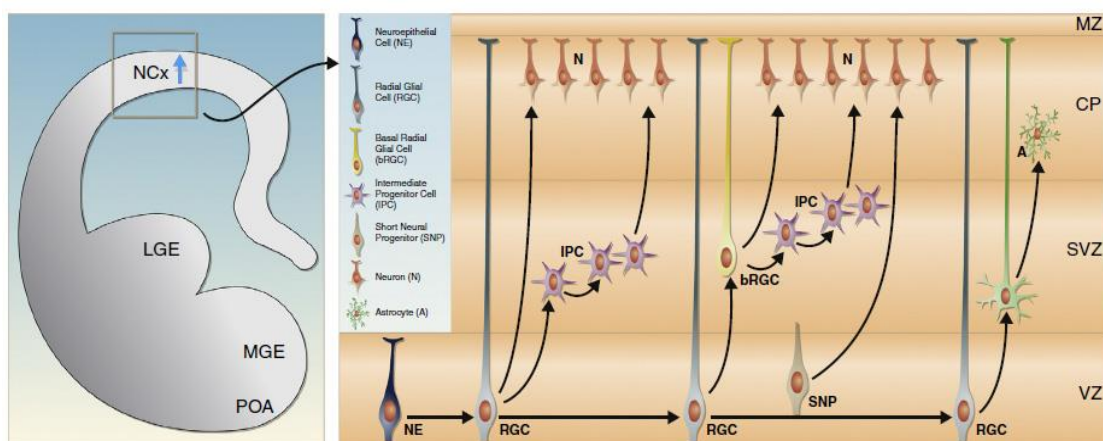


Figura 40. Migració radial de les cèl·lules progenitores en el cervell en desenvolupament. S'indiquen les diferents regions del cervell embrionari observades des d'un pla coronal: el neocortex (NCx), la lateral ganglionic eminence (LGE), la medial ganglionic eminence (MGE), i

la preoptic area (POA). La fletxa blava representa la direcció de la migració de les neurones excitatòries des de la zona ventricular del còrtex. Aquesta migració, que es dona en el neocòrtex, es mostra amb detall a la imatge de la dreta i es descriu al text principal. Imatge obtinguda i editada de (Marín and Müller, 2014).

La corticogènesi s'inicia al voltant del dies embrionaris 10-11 amb la primera cohort de neurones que migren des de la zona ventricular, donant lloc a la preplaca. Aquesta preplaca formada per les primeres neurones queda dividida, com a conseqüència d'un segon moviment migratòri que formarà la capa cortical (CP), en una capa més pròxima a la regió piamèter anomenada zona marginal (MZ) i en la subplaca (SP). En la zona marginal resideixen les Cajal Retzius provinents de la primera cohort neuronal que, a través de la secreció de la glicoproteïna de matriu extracel·lular relina, orientaran les conseqüents migracions neuronals a la seva correcta ubicació (Hevner et al., 2003; Frotscher, 2010). Això comporta que cada nova cohort neuronal sobrepassi l'anterior capa cortical i es dipositi a sobre formant-ne una de nova, de tal manera que les capes corticals més internes provindran de moviment migratoris ancestrals i les més externes provindran de migracions neuronals més recents (Fig.41). Durant el desenvolupament embrionari es formaran la cinquena i la sisena capa cortical, a diferència de la resta de capes que es consolidaran en el moment del naixement i que es trobaran limitades entre la primera capa formada per les Cajal Retzius i la subplaca, pròxima als ventricles cerebrals, que juntament amb la primera comparteixen el mateix origen i antiguitat neuronal (Molyneaux et al., 2007).

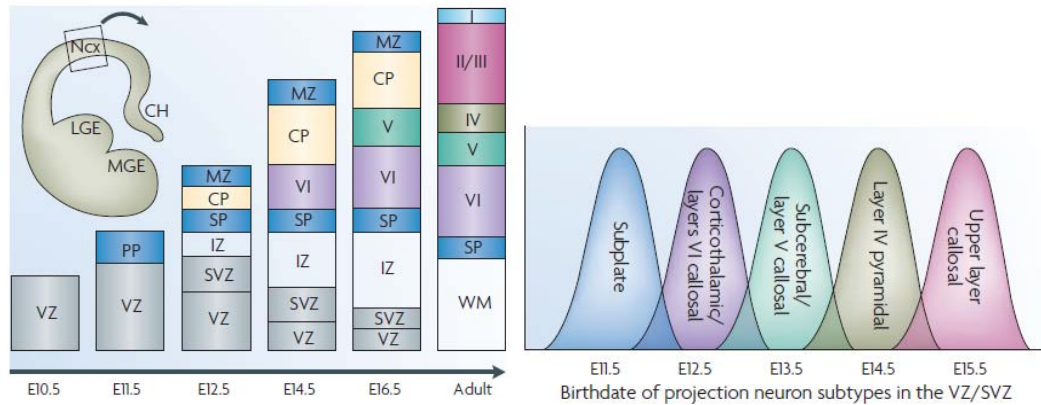


Figura 41. Corticogènesi. (A) Formació de les diferents capes corticals des de l'etapa embrionària fins l'adult. (B) Naixement solapat, en la zona ventricular i subventricular, dels diferents subtipus de neurones que projectaran i formaran les corresponents capes corticals. Imatge obtinguda de (Molyneaux et al., 2007).

5.1.2 Migració tangencial

En la migració tangencial, els precursors neuronals d'interneurones gabaèrgiques i oligodendròcits es desplacen principalment des de la medial ganglionic eminence (MGE) però també des les diferents regions que abarquen la lateral ganglionic eminence (LGE), la caudal ganglionic eminence (CGE), la preoptic area (POA) i el septum del subpallium a fi d'arribar al pallium del telencèfal, seguint una trajectòria paral·lela als ventricles del cervell i evitant l'entrada o el pas per l'estriat (Fig.42A). Durant aquest tipus de migració les interneurones interaccionen entre elles o amb els axons en creixement de les projeccions neuronals per arribar a la seva destinació en el còrtex, l'hipocamp o el bulb olfatori. Per evitar passar per la placa cortical, les interneurones més superficials migren a través de la MZ, i les més basals a través de la zona més profunda de la IZ o fins la SVZ (Fig.42B). Un cop passada l'etapa embrionària resten precursors de neurones glutamatèrgiques a la VZ del còrtex i precursors d'interneurones provinents de la LGE i la CGE a la SVZ, que es poden diferenciar i migrar radialment fins assolir la corresponent capa cortical (Meyer et al., 1998; Anderson et al., 2001; Marín et al., 2010; Bartolini et al., 2013).

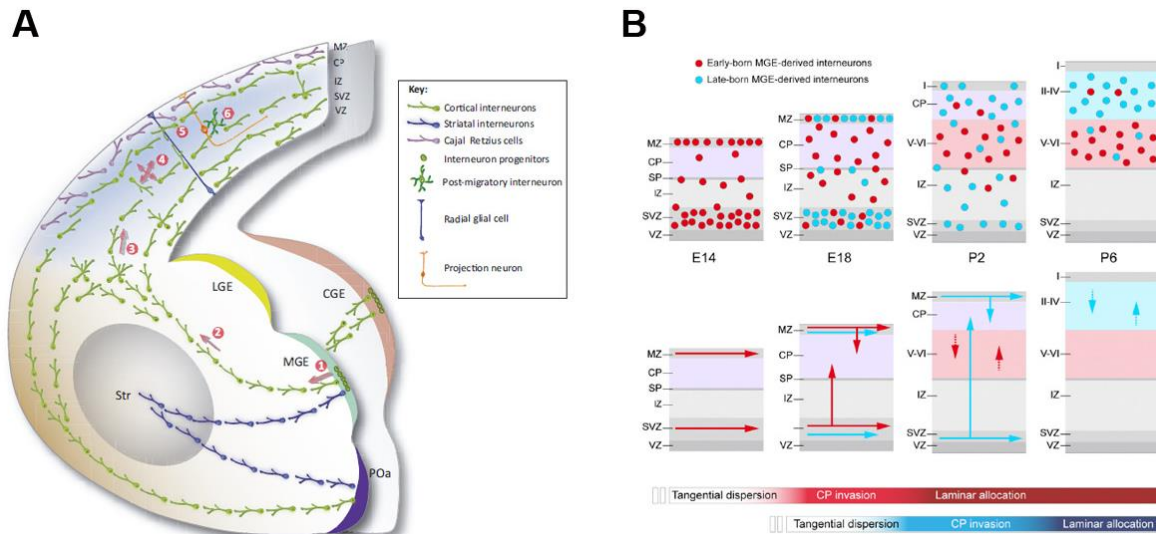


Figura 42. Migració de les interneurons gabaèrgiques. (A) Patrons de migració de les interneurons en el telencèfal en desenvolupament . La imatge mostra una hemisecció rostral i caudal del cervell embrionari a E15, on la numeració indica la seqüència de processos que ocorren en el procés migratori fins que la interneurona assolix la seva corresponent destinació. (B) Representació esquemàtica de la integració de les interneurons gabaèrgiques al neocòrtex. La imatge ha estat obtinguda i modificada de (Bartolini et al., 2013; Guo and Anton, 2014).

De la mateixa manera que trobem diverses subpoblacions de neurones piramidals en funció de la seva connectivitat i disposició en les capes corticals, també hi ha fins a 20 classes diferents d'interneurons en funció de la seva morfologia, neuroquímica i característiques electrofisiològiques. La distribució d'aquestes en les capes difereix en les diferents subpoblacions; com n'és el cas de les interneurons provinents de la MGE, majoritàriament formades per poblacions positives pels marcadors d'interneurons gabaèrgiques parvoalbúmina i somatoestatina, que responen a patrons semblants i associats a la migració de les neurones piramidals durant el desenvolupament embrionari (Fig.43). Per això alteracions en la migració i per tant distribució cortical de les neurones piramidals es traslladen en disfuncions en la migració d'aquestes subpoblacions d'interneurons gabaèrgiques, alterant l'equilibri excitatori-inhibitori dels circuits neuronals (Marín and Müller, 2014).

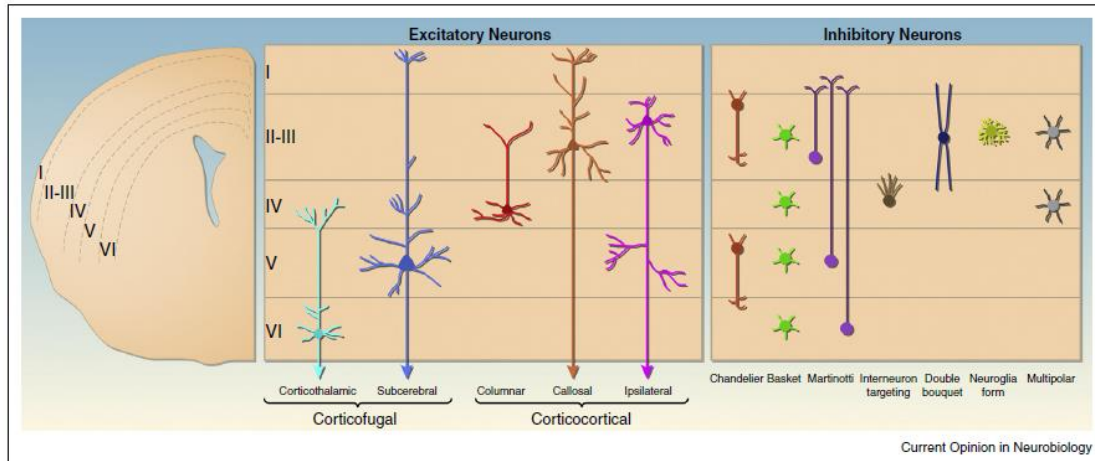


Figura 43. Tipus de neurones inhibidores respecte les excitatòries i distribució d'aquestes en les corresponents capes corticals. Imatge obtinguda de (Marín and Müller, 2014).

6. Malalties associades a defectes en la migració neuronal

El trencament de l'harmonia, la correcta disposició i funcionament de les neurones glutamatèrgiques i gabaèrgiques associat al procés de migració i d'interacció amb les diferents molècules guia i proteïnes de la matriu extracel·lular, condueix a diferents desordres neurològics exemplificats en models murins com els ratolins *reeler* i els ratolins lissencefàlics; però també en humans, traduint-se en malalties psiquiàtriques com la depressió major, les Autism Spectrum Disorder (ASD), l'epilepsia o l'esquizofrenia (Fig.44B).

Tant els ratolins *reeler* com els lissencefàlics principalment presenten defectes en la migració de les neurones piramidals i per tant alteracions en la distribució de les diferents capes corticals. La relina és secretada per les neurones de la zona marginal del còrtex i per tant el seu defecte com a molècula guia evita que les neurones piramidals puguin superar la subplaca (Fig.44A). Com a conseqüència no poden disposar-se per sobre de les altres capes corticals formades per neurones provinents de migracions prèvies i s'obté un patró i disposició invertida de les capes en la placa cortical (D'Arcangelo et al., 1995). Un cas semblant passa en els models lissencefàlics de ratolí i pacients amb el Mieller Diecker syndrome (MDS) que presenten mutacions en el gen Lissencephaly-1 (LIS1), proteïna que juntament amb altres proteïnes com la

lamina, la nuclear distribution gene E-like homolog 1 (Ndel1) i la doblecourtin (Dcx) i sota l'estímul de la relina interaccionen amb els microtúbuls i participen en processos tant indispensables en la migració radial com la nucleoquinesis (Lambert de Rouvroit and Goffinet, 2001; D'Arcangelo, 2006; Coffinier et al., 2011). La desregulació d'aquesta via es caracteritza per un ampli ventall de fenotips en funció de la regió afectada per la mutació i la quantitat de proteïna LIS1 activa, però es defineix principalment per una desorganització de les capes corticals sumat a una allisament i aprimament del còrtex (Hirotsune et al., 1998; Assadi et al., 2003; Wynshaw-Boris, 2007).

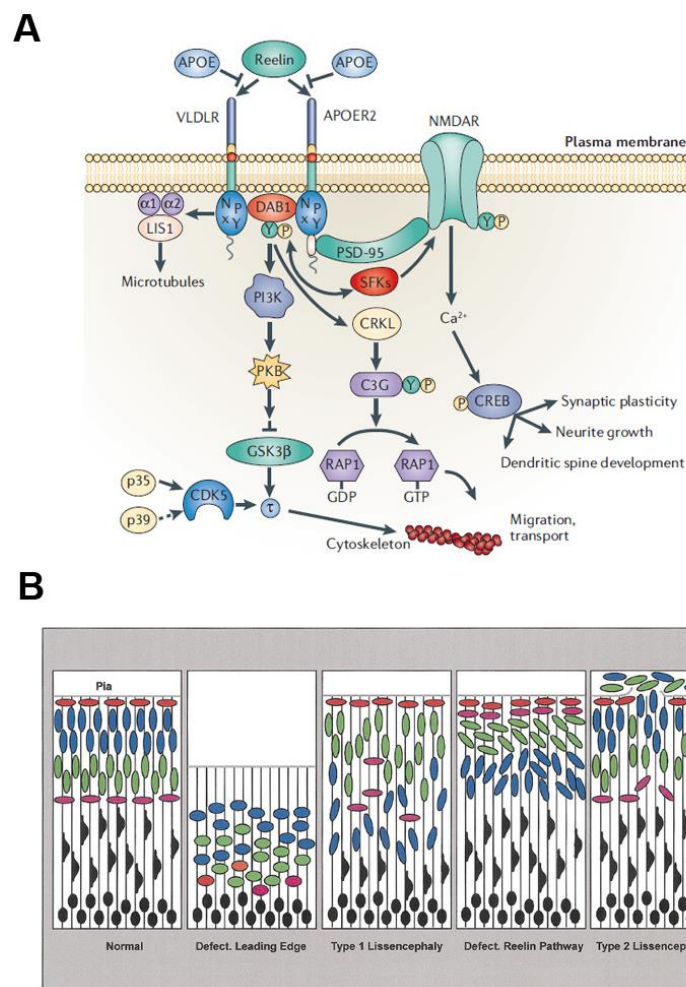


Figura 44. Paper de la relina i LIS1 en la migració neuronal dependent dels microtúbuls. (A) Via de senyalització de la relina a neurones (B) Esquema de la distribució de les neurones corticals en un cervell normal i en còrtexs que presenten anomalies durant el seu desenvolupament. Imatges obtingudes i editades de (Lambert de Rouvroit and Goffinet, 2001; Herz and Chen, 2006).

Alteracions en la via induïble per reelin comporten una desregulació de la via de la PI3K-PKB que implica una reducció de l'activitat de PKB i una sobreactivació de la proteïna associada a microtúbuls GSK3. L'activació permanent de GSK3 es troba associada a trastorns psiquiàtrics com l'esquizofrenia, les fases maníacques del síndrome bipolar o l'autisme. Des de mitjans del segle XX se'ls ha aplicat als pacients, amb efectes pal·liatius, les teràpies d'electroconvulsió i tractaments químics com el liti o l'àcid valproic per descobrir anys més tard que els diferents tractaments compartien GSK3 com a diana inhibidora (Jope, 2003, 2011; Emamian et al., 2004; Prickaerts et al., 2006; Ackermann et al., 2010; Mines et al., 2010; Emamian, 2012).

En els trastorns anteriors, sobretot en el cas de l'esquizofrènia, la patologia no sempre es troba lligada a problemes en la migració radial de les neurones piramidals, sinó que també inclou alteracions en les poblacions d'interneurones gabaèrgiques i els fenòmens de migració tangencial associada a elles. L'esquizofrènia afecta un 1% de la població mundial i es sol desenvolupar durant l'adolescència o en l'inici de la vida adulta. Aquest trastorn té una etiologia genètica però sobretot cursa sota la influència de diferents factors externs desconeguts fins al moment, amb l'excepció del consum de cànnabis durant l'adolescència. La majoria de pacients amb esquizofrènia no presenten una reducció en el nombre de neurones sinó dèficits en la sincronització entre les neurones piramidals i les interneurones gabaèrgiques del còrtex prefrontal i cingulat (Thune et al., 2001) (Fig.45A).

Les diferents hipòtesis associades a l'alteració de l'harmonia cortical es basen en una dessensibilització generalitzada de les neurones glutamatèrgiques corticals a l'inhibidor GABA secretat per les interneurones. D'entre les diferents poblacions d'interneurones, les "Basquet cells" i les "Chandelier", que s'ubiquen en les capes 3 i 4 del còrtex i són parvoalbúmina positives, estarien implicades en la malaltia (Fig.45C/D). Aquestes poblacions d'interneurones presentarien una reducció en la síntesi, dependent de BDNF i de l'activació de Trk, de l'enzim glutamic acid decarboxylase (GAD67) que catalitza la conversió de l'àcid glutàmic al neurotransmissor inhibitori GABA (Cellerino et al., 1996;

Weickert et al., 2003; Lewis et al., 2005; Akbarian and Huang, 2006; Curley and Lewis, 2012; Glausier et al., 2014).

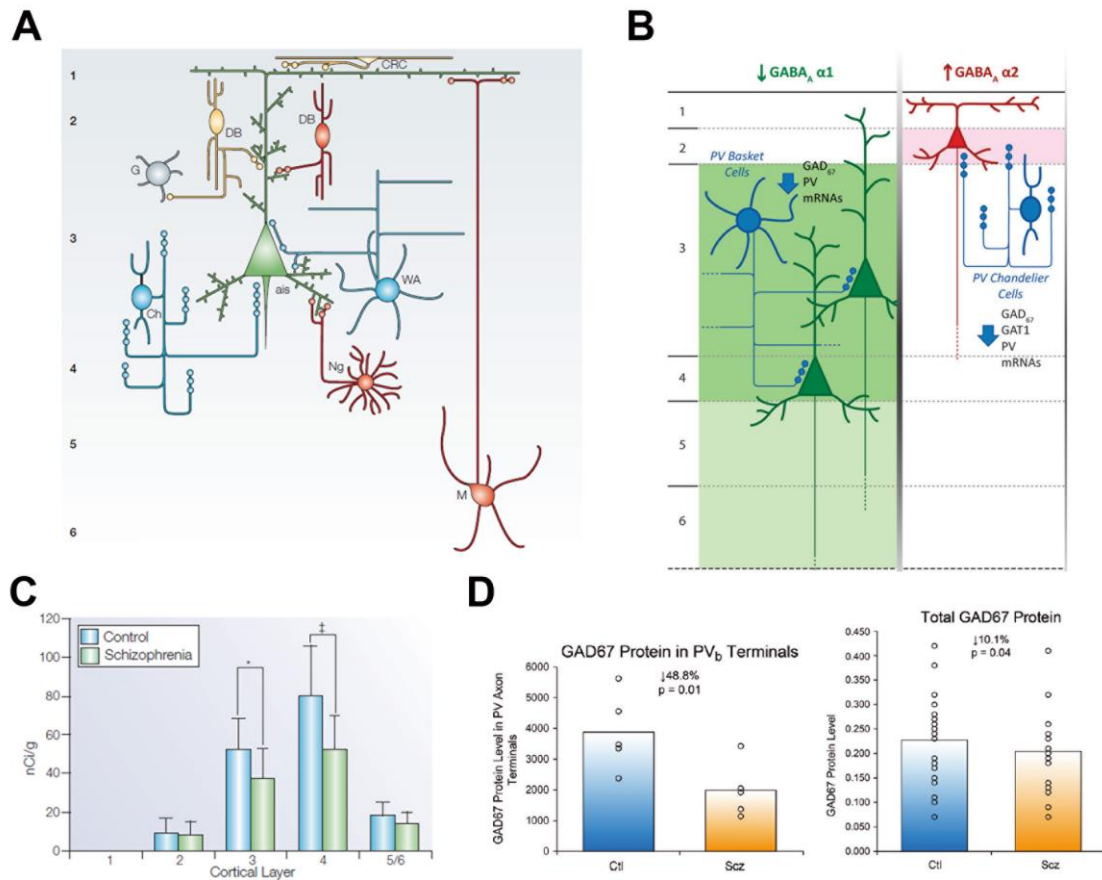


Figura 45. Desregulacions bioquímiques de les interneurons en la patologia de l'esquizofrènia. (A) Distribució i característiques morfològiques i bioquímiques de les diferents subpoblacions de neurones corticals gabaèrgiques. Aquestes subpoblacions les conformen les chandelier (Ch), les wide arbor (WA), les calbindin-expressing double bouquet (DB) indicades en vermell, les calretinin-expressing (DB) indicades en groc, les neurogliaform (Ng), les Martinotti (M) i les Cajal–Retzius cell (CRC). L'axó de les neurones piramidals, diàna de les interneurons, es representa com a l'axó inicial segment (ais). (B) Esquema de les desregulacions transcripcionals que ocorren en les interneurons d'una capa cortical específica, les quals es trobem íntimament associades a alteracions en l'expressió de les subunitats del receptor GABA de les neurones piramidals del còrtex prefrontal dorsolateral de pacients amb esquizofrènia. (C) Gràfic on es mostra l'expressió de la parvalbúmina en les diferents capes del còrtex prefrontal dorsolateral de pacients amb esquizofrènia respecte els control. (D) Gràfica on es comparen tant els nivells totals de GAD67 en el còrtex prefrontal, com els presents en les terminals axòniques de les neurones positives per parvalbúmina de pacients control respecte els que pateixen esquizofrènia. Imatges extretes i editades de (Lewis et al., 2005; Beneyto et al., 2011; Curley and Lewis, 2012)

La disminució en la secreció d'aquest neurotransmissor es deu en molts casos a un mecanisme compensatori procedent de les interneurons per potenciar la debilitada senyal glutamatèrgica, perpetuada amb una reducció de l'expressió dels receptors d'AMPA i d'NMDA que reben les neurones piramidals del còrtex. Aquesta situació es dona en alguns pacients d'esquizofrènia per una alteració en la via NRG1/ErbB4, la qual participa en l'estabilització dels receptors excitatòris d'AMPA i per tant en la consolidació i plasticitat sinàptica de les neurones piramidals; o bé per una reducció del tàlem associat a una degeneració o atrofia de les neurones que el conformen, i per tant un empobriment de la comunicació amb el còrtex a través de les projeccions talàmico-corticals (Popken et al., 2000; Li et al., 2007; Hu et al., 2014) (Fig.46). D'altra banda, en alguns casos d'esquizofrènia la dessensibilització de les neurones glutamatèrgiques respon a una reducció de fins al 20% en l'expressió de les subunitats $\alpha 1$ i $\beta 2$ dels receptors del neurotransmissor GABA a les neurones piramidals presents en les capes 3 i 4 del còrtex (Fig.45B); regió poblada i regulada inhibitoriament per poblacions parvoalbumina positives d'interneurons gabaèrgiques (Beneyto et al., 2011).

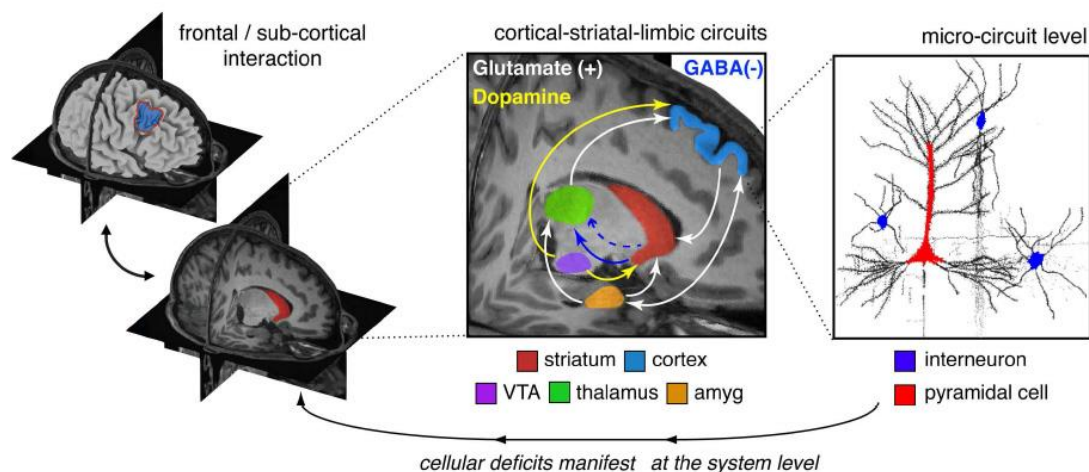


Figura 46. Il·lustració conceptual per computació on es mostren les àrees i microcircuitos que estarien alterats en la malaltia de l'esquizofrènia. Imatge obtinguda de (Anticevic and Corlett, 2012).

En definitiva, qualsevol de les situacions anteriors comporten un trencament de la sincronització elèctrica entre els dos tipus neuronals, resultant en una disminució de les ones θ i γ en el còrtex prefrontal. Aquesta alteració es

tradueix en alguns dels símptomes del trastorn psiquiàtric, com la psicosis o l'afectació i consolidació de la memòria de treball (Haenschel et al., 2009; Minzenberg et al., 2010) (Fig.47).

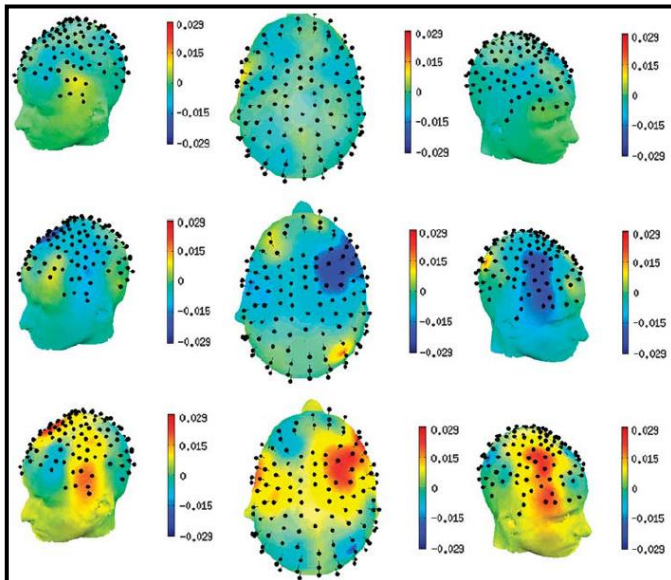


Figura 47. Topografia de l'activitat cerebral resultant d'una electroencefalografia aplicada a pacients control respecte a pacients esquizofrènics. El codi de colors representa el rang d'ones gamma (30–80 Hz) durant l'experiment cognitiu. El panell superior representa al grup control; el del mig, al grup de pacients esquizofrènics i l'últim resulta de la diferència entre ambdós grups. Imatge obtinguda de (Minzenberg et al., 2010).

7. Història i evolució dels models animals de PDK1

Un cop es va descobrir que PDK1 era la quinasa responsable, en resposta a PIP3, de fosforilar i activar PKB, i que per tant havia de jugar un paper important en les respostes cel·lulars intercedides per la via PI3K-PKB, es varen analitzar les conseqüències de l'absència de PDK1 en diferents models eucariotes (Alessi et al., 1997; Currie et al., 1999). Així, la deleció del gen de PDK1 a través d'estratègies de *knockout* impossibilitava l'activació de PKB, RSK i S6K i resultava indispensable per la viabilitat i el desenvolupament d'organismes com *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* i ratolí (Casamayor et al., 1999b; Paradis et al., 1999; Williams et al., 2000; Cho et al., 2001).

Amb l'objectiu d'analitzar l'impacte de la deleció del gen de PDK1 en mamífers, es va dissenyar un al·lel *knockout* condicional en el que els exons tres i quatre del gen de PDK1 de ratolí, que codifiquen per regions essencials del domini catalític, es troben flanquejats per llocs LoxP i per tant poden ser reconeguts i escindits per la Cre-Recombinasa, donant lloc a un al·lel nul. A més a més, la no eliminació del marcador de selecció procariota de la neomicina, també

flanquejat per dos seqüències LoxP, va permetre la generació d'un al·lel hipomorf en el què una senyal acceptora d'splicing ubicada al inici de la ORF (open reading frame) de la neomicina procariota interferia amb l'expressió normal del gen de PDK1. Els embrions homozigots per l'al·lel *knockout* de PDK1 ($PDK1^{-/-}$) eren més petits que els embrions control i morien al dia 9.5 embrionari a causa de grans defectes a nivell de desenvolupament. D'altra banda, els homozigots per l'al·lel hipomorf ($PDK1^{fl/fl}$), de la mateixa manera que els heterozigots per l'al·lel hipomorf i l'al·lel *knockout* de PDK1 ($PDK1^{-/fl}$) eren viables, fèrtils i arribaven a l'edat adulta; tot i expressar només entre un 10 i un 20% de la proteïna PDK1. Aquesta reducció en els nivells de la quinasa resultaven en una reducció de la mida del ratolí i els seus òrgans en un 40-50%, deixant entreveure el paper de PDK1 en el control del creixement cel·lular (Lawlor et al., 2002) (Fig.48).

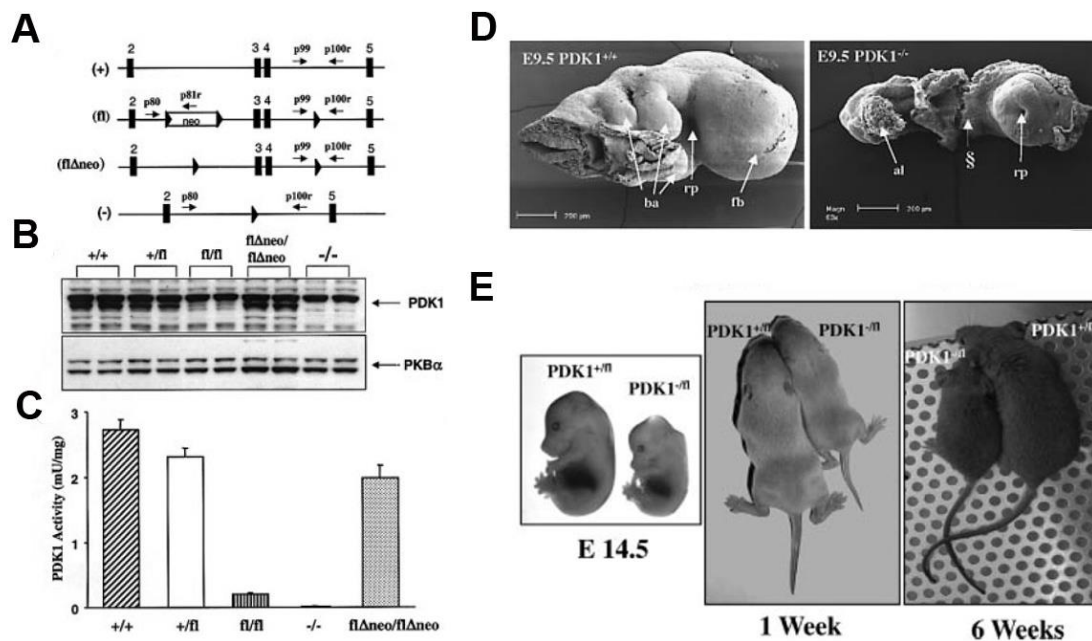


Figura 48. Generació de ratolins *knockout* i hipomorfs de PDK1. (A) Diagrama il·lustratiu dels diferents al·lells de PDK1 generats. (B) Detecció per *Western Blot* de la quantitat total de PDK1 i PKB d'extractes proteics procedents de cèl·lules ES que expressaven els corresponents al·lells de la quinasa. (C) Assajos proteïna quinasa amb els corresponents extractes proteics procedents de cèl·lules ES dels genotips indicats. (D) Imatges representatives obtingudes amb scanning electron microscopy (SEM) on es mostra la morfologia dels embrions *knockout* de PDK1 respecte dels control. (E) Fotografies

comparatives dels ratolins hipomorfs de PDK1 generats respecte dels control a nivell embrionari, postnatal i adult. Imatges obtingudes de (Lawlor et al., 2002).

Estudis bioquímics i estructurals previs havien definit la implicació indispensable del dominis d'interacció PH i PIF-pocket en la senyalització per PDK1, així com també els aminoàcids essencials que participaven en la interacció amb PIP3 i el substrat respectivament (Currie et al., 1999; Biondi, 2002). A fi d'intentar superar els defectes a nivells de desenvolupament del ratolí *knockout* i per tant obtenir ratolins viables, es varen realitzar estratègies de *knockin* on es mutaven els aminoàcids essencials pel correcte funcionament de cada domini de PDK1 en cèl·lules embryonic stem cells (ES). Les cèl·lules ES amb el domini PIF-pocket de PDK1 inhabilitat pel canvi de la leucina 155 a un àcid glutàmic (L155E) presentaven una inhibició de l'activitat de PKC, S6K, RSK i SGK; mentre que les cèl·lules ES que presentaven el PH-domain inactivat per la triple mutació de l'arginina 472 a la 474 a leucines (RRR→LLL), presentaven defectes només en l'activació de PKB (Collins et al., 2003; McManus et al., 2004). Els ratolins amb la mutació LLL del PH-domain i la L155E del PIF-pocket de PDK1 tampoc eren viables i morien entre els dies 11 i 12 del desenvolupament embrionari (McManus et al., 2004) (Fig.49).

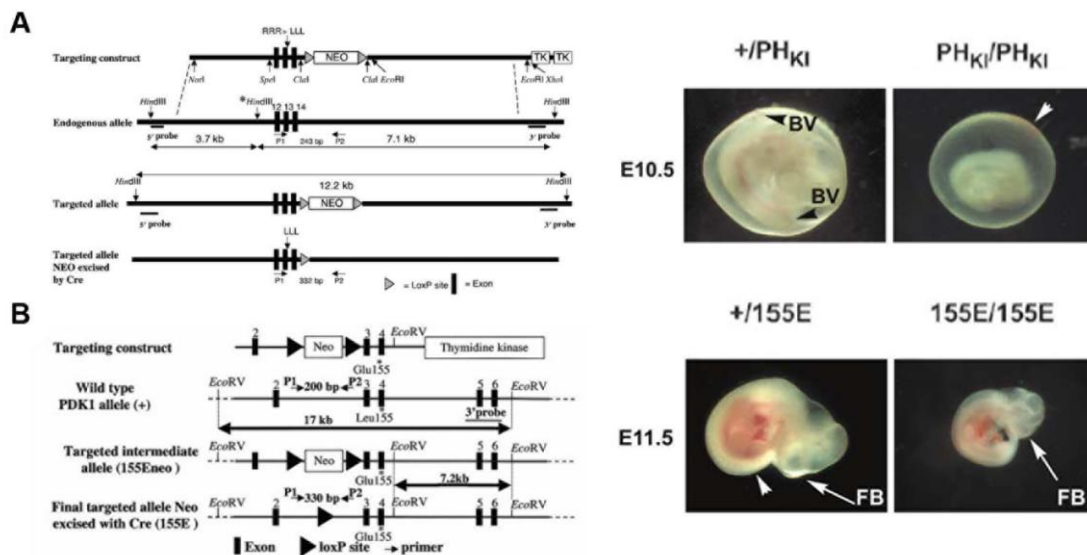


Figura 49. La primera estratègia de *Knockin* del PIF-pocket i del PH-domain de PDK1. (A) Diagrama il·lustratiu de l'estratègia *knockin* del domini PH de PDK1 en cèl·lules ES. En la imatge de la dreta, obtinguda a dia E10.5, es compara morfològicament els embrions dels corresponent genotip que es troba indicat al marge superior. (B) Diagrama il·lustratiu de

l'estratègia *knockin* del domini PIF-pocket de PDK1 en cèl·lules ES. En la imatge de la dreta, obtinguda a dia E11.5, es compara morfològicament els embrions dels corresponent genotip que es troba indicat al marge superior. Les fletxes en les corresponents imatges indiquen els Blood vessels (BV) i el forebrain (FB). Imatges obtingudes i modificades de (Collins et al., 2003; McManus et al., 2004).

De forma contemporània s'havien generat ratolins KO de PDK1 específics de teixit, que eren viables però morien a les poques setmanes de néixer (Mora et al., 2003, 2005).

A partir d'aquest escenari es va decidir de dissenyar tres estratègies per dirigir la mutació del PIF-pocket de PDK1 al teixit a estudiar. Amb dos dels tres mètodes es va aconseguir generar ratolins viables que expressaven la mutació del PIF-pocket de PDK1 en el teixit muscular, però només l'estratègia del *minigene* es va utilitzar per generar ratolins que expressaven aquest domini de PDK1 inhabilitat a SNC.

L'estratègia del *minigene* consisteix en el disseny d'un al·lel condicional de PDK1 que conté la mutació L155E introduïda en l'exó 4 per mutagènesi dirigida i un *minigene* que correspon a la pauta oberta de lectura de PDK1 corresponent als exons tres fins al catorze seguit d'una seqüència molt forta de finalització de la transcripció. A més a més, aquest minigene es troba flanquejat per seqüències LoxP de 34 parells de bases que són reconegudes per la Cre-recombinasa del bacteriòfag P1. Els ratolins que expressen l'al·lel condicional de PDK1 es varen creuar amb ratolins que expressen la Cre-Recombinasa sota el promotor específic del teixit d'interès, en el cas del múscul esquelètic i cardíac el promotor de la muscle creatin kinase (Mck) i en el cas del sistema nerviós central el promotor neuronal de la nestina. En els teixits dels ratolins resultants on no s'expressa la Cre-Recombinasa es traduirà la proteïna funcional de PDK1, mentre que en els teixits diana la Cre-Recombinasa reconeixerà els llocs LoxP del *minigene*, l'escindirà i per tant s'expressarà la proteïna mutant (Fig.50A). Els ratolins PDK1 L155E *knockin* condicional específics de múscul expressaven nivells de PDK1 comparables als control però tenien el domini PIF-pocket inhabilitat al múscul esquelètic i com a conseqüència presentaven defectes en l'activació de la S6K i el seu substrat S6, mentre que mantenien intacte l'activació de PKB i els seus substrats

(Fig.50C). Els ratolins neixien en les esperades proporcions mendelianes, eren viables i amb una mida normal, i no presentaven alteracions en la homeòstasi de la glucosa ni en la captació muscular de glucosa dependent d'insulina (Fig.50B). Inesperadament, es va constatar que en els teixits on no s'expressava la Cre-Recombinassa es transcrivía i es traduía una quantitat significativa de proteïna amb el PIF-pocket de PDK1 inhabilitat. Aquesta expressió no desitjada resulta del fet que la maquinària transcripcional sobrepassa la seqüència de finalització de la transcripció del *minigene*, mentre que la maquinària d'*splicing* utilitza el donador situat al final de l'exó dos i l'acceptor ubicat a l'inici de l'exó tres endogen, eliminant així tota la seqüència del *minigene* (Fig.49D). Aquest fenomen ha permès la generació de diferents sèries al·lèliques associades a quantitats creixents de proteïna mutant de PDK1 que permeten analitzar amb més precisió la via PI3K-PDK1-PKB i les funcions atribuïdes a cada quinasa de la família de les AGC (Bayascas et al., 2006).

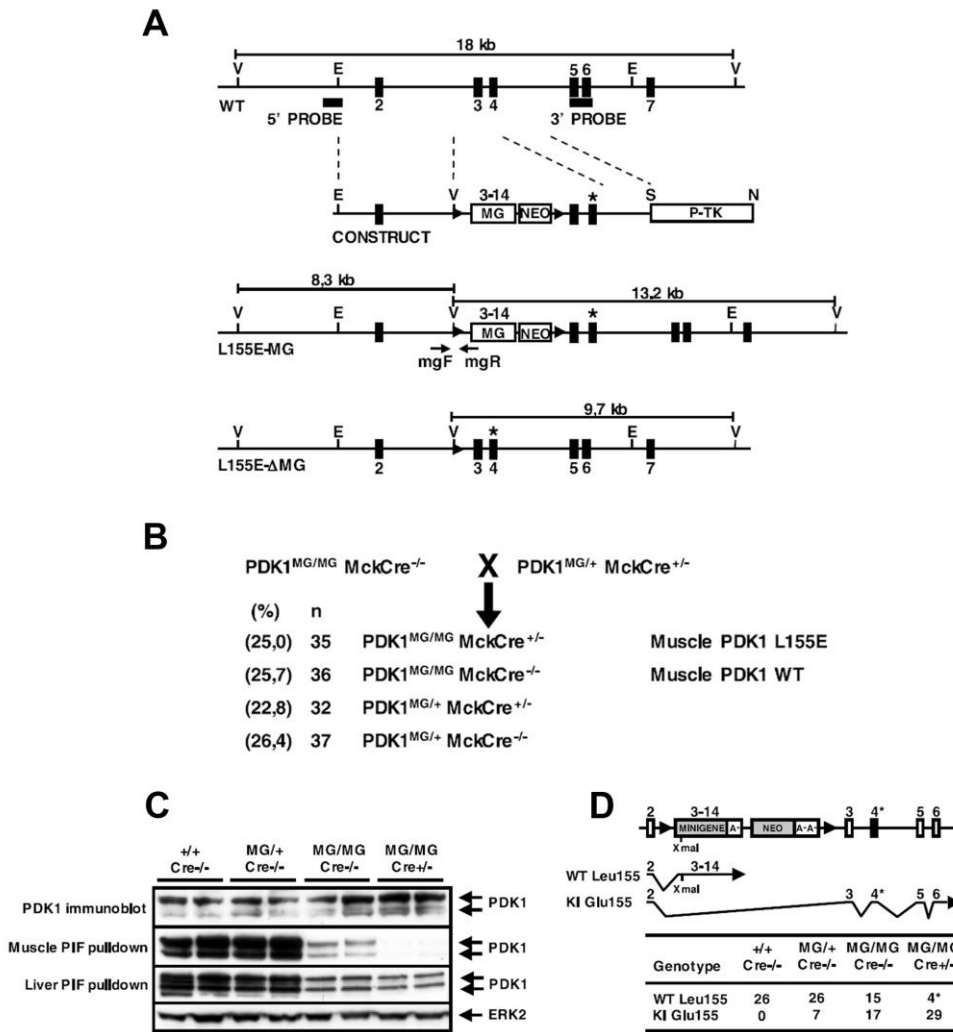


Figura 50. Knockin condicional de teixit del PIF-pocket de PDK1. (A) Diagrama de l'estratègia del *Minigene* per crear el *knockin* condicional específic de teixit del PIF-pocket de PDK1. (B) Estratègia de creuaments per generar els ratolins que expressen la proteïna PDK1 L155E mutant al múscul. El nombre (n) i la proporció (%) de ratolins de cada genotip resultants del creuament representatiu entre un ratolí PDK1^{+/-} Cre⁺ i un PDK1^{-/-} Cre⁻ es troben indicats. (C) La proteïna PDK1 va se purificada per afinitat a la resina PIF-sefarosa a partir d'extractes proteics de fetge i múscul dels corresponents genotips. (D) Esquema on es reflexa el *leaking* en l'expressió de la proteïna mutant de PDK1 a partir de les dades obtingudes d'amplificar per RT-PCR l'RNA obtingut del múscul cardíac dels corresponents genotips. Imatges obtingudes i modificades de (Bayascas et al., 2006).

De forma paral·lela l'any 2004 es va publicar el cristall del domini PH de PDK1 on es mostrava els diferents aminoàcids que conformaven aquest domini i que participaven en la interacció amb els diferents fosfatidilinositols. L'anàlisi del cristall d'aquest domini de PDK1 va ajudar a entendre la causa de la letalitat

embrionària dels embrions que expressaven la mutació en 3 de les arginines d'aquest domini, on dues d'elles interaccionaven amb l'anell inositol de PIP3 però l'arginina 474 establia enllaços imprescindibles pel correcte plegament del domini PH. La mutació d'aquest aminoàcid comportava la desestabilització de PDK1 i la seva conseqüent degradació, fet que comportava la creació d'una fenocòpia del *knockout* de PDK1 i impedia discernir quines de les conseqüències fenotípiques eren degudes a la mutació i quines a una reducció dels nivells l'expressió de PDK1. A partir d'aquí i tenint en compte que la lisina 465 establia interaccions indispensables amb el segon missatger PIP3 però sense participar en el plegament del domini, es va generar un model *knockin* de ratolí pel PH-domain de PDK1 basat en canvi de la lisina 465 per una àcid glutàmic, que inhabilitava el domini impeding la interacció amb PIP3 però mantenia la integritat de la quinasa (Fig.51).

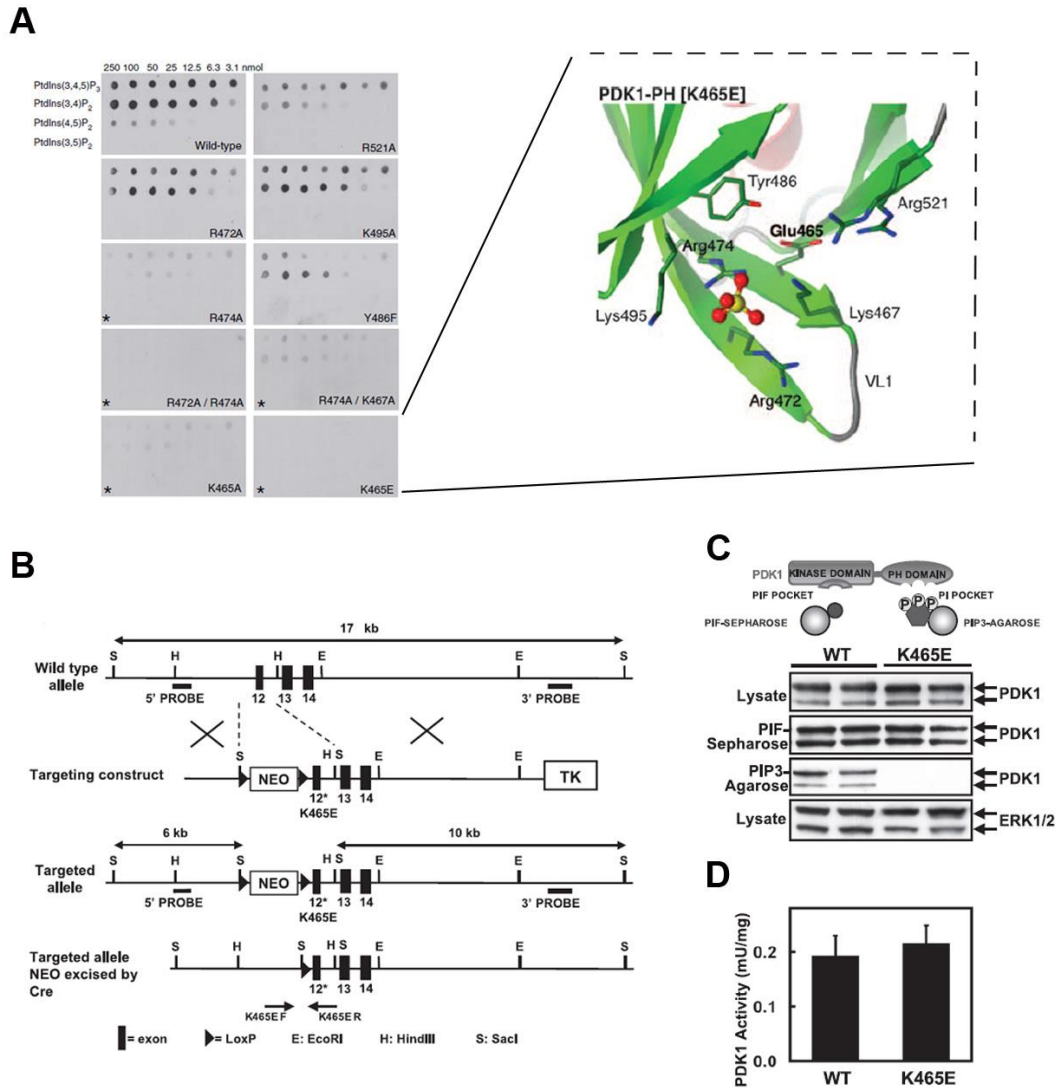


Figura 51. Generació dels ratolins knockin K465E de PDK1. (A) A la dreta, imatge ampliada de l'estructura cristal·logràfica del domini PH de PDK1 mutat, on al centre es realça en negre el canvi de la lisina 465 per un àcid glutàmic. A l'esquerra, panell on s'analiza l'especificitat d'unió a fosfatidilinositols de la proteïna PDK1 wild type i de la mutant mitjançant l'assaig de solapament lípid-proteïna. (B) Diagrama de l'estratègia per generar els ratolins PDK1^{K465E/K465E}. (C) La proteïna PDK1 va ser purificada per afinitat a la resina PIP3-agarosa i a la PIF-sefarosa a partir d'extractes proteics de fetge dels corresponents genotips. En el panell superior es mostra com interaccionen els dominis de PDK1 amb les corresponents resines. (D) Assajos proteïna quinasa amb els extractes proteics procedents del fetge dels diferents genotips i amb el T308tide peptide com a substrat. Imatges obtingudes i editades de (Komander et al., 2004; Bayascas et al., 2008a)

Els ratolins que presenten aquesta mutació tenen nivells reduïts d'activitat PKB i de la fosforilació dels diferents substrats regulats per aquesta quinasa, així

com també una reducció de l'activitat de las S6K i el seu substrat S6 indirectament per la sobreinhibició del complex mTORC1 per part de TSC2 i PRAS40, substrats de PKB. D'altra banda, els ratolins mutants presenten una activació normal de substrats independents del domini PH de PDK1 com ara RSK, SGK o algunes PKC. La desregulació de la via PDK1-PKB en els ratolins que presenten la mutació del PH-domain de PDK1 els comporta una reducció de la mida respecte els animals control associada a la hipoactivació d'mTORC1 (Fig.52B). Aquests ratolins presenten els clars símptomes de la diabetis tipus 2 d'intolerància a la glucosa i resistència a la insulina, tot i que aconsegueixen mantenir la homeòstasi de glucosa i la demanda d'insulina augmentant la massa del pàncreas. En individus d'un any d'edat també es presenta una reducció del 50% del pes associada a una reducció de la massa del teixit adipós (Bayascas, 2008; Bayascas et al., 2008b) (Fig.52C). A nivell del sistema nerviós, la reducció de l'activitat de PKB causada per la mutació K465E de PDK1 no es tradueix en una reducció de la viabilitat i supervivència cel·lular, fet que es podria explicar per mecanismes compensatoris orquestrats per altres vies. Contràriament, la reducció en l'activació de PKB sí que comporta defectes a nivell de polarització i elongació axonal durant el desenvolupament embrionari que són revertits en l'organisme adult (Zurashvili et al., 2013) (Fig.52A).

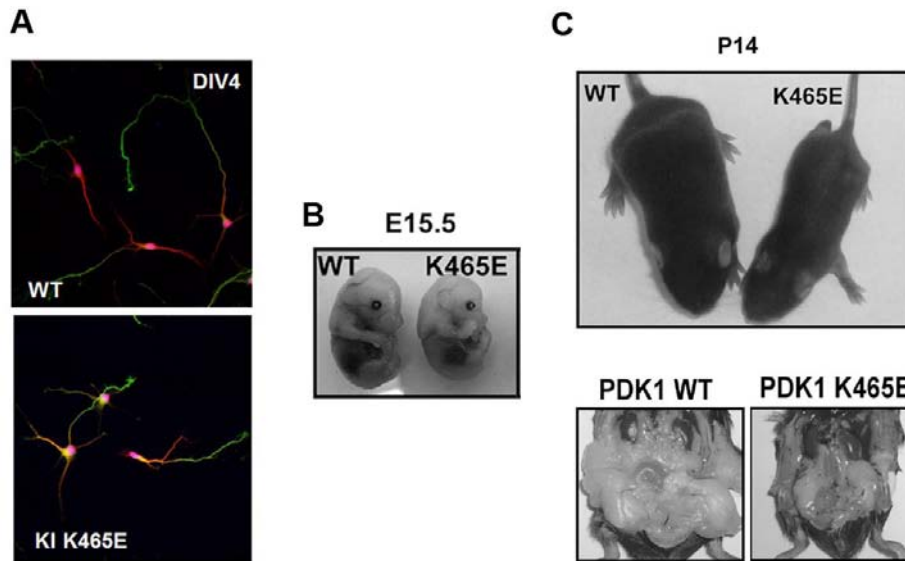


Figura 52. Conseqüències de la mutació del domini PH de PDK1. (A) Imatges obtingudes amb microscopi d'epifluorescència a 20X de neurones hipocampals procedents de ratolins wild type (WT) i *knockin* (KI K465E) pel PH-domain de PDK1. Es distingeix l'axó en verd pel marcador axonal Tau; les dendrites en vermell pel marcador dendrític MAP2 i en blau el nucli. (B) Fotografies representatives dels corresponents genotips d'embrions a E15.5. (C) Imatges del ratolins WT i PDK1 K465E generats a dia postnatal 14 (P14). En la fotografia inferior es mostra el teixit adipós abdominal dels corresponents ratolins d'un any d'edat. Imatges obtingudes i modificades de (Bayascas, 2008; Zurashvili et al., 2013).

OBJECTIUS

Objectiu principal: Determinar la funció de PDK1 al sistema nerviós central a partir de la caracterització dels ratolins *knock-in* condicionals que expressen la mutació L155E de PDK1.

Objectiu 1: Confirmar que l'expressió de la mutació L155E de PDK1 es dona específicament al SNC i que inhabilita el domini PIF-pocket de la quinasa, sense alterar els nivells totals de la proteïna.

Objectiu 2: Estudi de l'impacte bioquímic que genera la mutació L155E de PDK1 en l'activació de les diferents AGC quinases activables per PDK1 .

Objectiu 3: Avaluar el paper de PDK1 i les quinases dependents del seu domini PIF-pocket en les respostes de supervivència i viabilitat neuronal.

Objectiu 4: Avaluar el paper de PDK1 i les quinases dependents del seu domini PIF-pocket en el desenvolupament neuronal i la conseqüent formació del cervell adult.

Objectiu 5: Explorar la implicació de PDK1 en la conducta i en les funcions cognitives dels ratolins.

MATERIAL I MÈTODES

1. Model animal

Els ratolins Nestin-Cre varen ser cedits pel professor Ulrich Mueller de l'Scripps Research Institute (Tronche et al., 1999), mentre que els ratolins *knockin* condicional L155E de PDK1 i els corresponents procediments de genotipatge varen ser desenvolupats prèviament pel Dr. José Ramón Bayascas sota la supervisió del professor Dario Alessi de la Universitat de Dundee (Bayascas et al., 2006).

El manteniment de les diferents colònies de ratolins va ser realitzada a l'estabulari de rosegadors de la Universitat de Lleida, on els animals s'estabulaven en unes condicions *ad libitum* de menjar i beure, de temperatura entre 19 i 22°C, al voltant de 40-60% d'humiditat i en un cicle d'il·luminació de 12 hores de llum i 12 hores de fosc d'acord amb el Real Decret 223/1988.

Els diferents procediments animals varen desenvolupar-se d'acord a la normativa europea 201/63/UE i segons la normativa 214/1997 de cura i ús dels animals de laboratori, aprovada pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (CEEAH-2291) i sota la llicència de la Generalitat de Catalunya (DAAM-7493).

2. Anàlisi genètic

2.1 Aproximació genòmica de l'expressió de la mutació L155E de PDK1

L'estratègia va consistir en amplificar el DNA inclòs en el constructe del *minigene* a partir de 2 encebadors: un *forward* (5'-3') que hibrida amb la regió gènica GGC AGC CTA TGC AAG GAG ACA GTG A de l'exó 3, i un *reverse* (5'-3') que hibrida amb la regió gènica GAA GGG GTG ATC CAG GCG TGA CAT C de l'exó 4. D'aquesta forma diferenciarem al gel d'agarosa una banda de 496 pb que inclou la regió intrònica entre els exons 3 i 4 que conté la mutació L155E, i una altra banda més petita de 230 pb corresponent a la regió d'exons 3 i 4 del minigen lliure d'intró.

La purificació de l' àcid desoxiribonucleic (ADN) genòmic es va realitzar a partir dels *pellets* procedents de les mostres resultants del procés d'extracció proteica. La digestió de cada *pellet* es va realitzar amb un tampó de lisis que

contenia 0.1 mg/ml de proteïnasa K durant tota la nit a 56°C i en agitació de 150 rpm. El contingut proteic de la mostra es va precipitar afegint 167 µl de NaCl 5M i deixant-t'ho 5 minuts a temperatura ambient en una agitació de 800 rpm. Després de centrifugar durant 5 minuts a 13.000 rpm, es va recuperar l'ADN genòmic del sobrenedant obtingut i es va precipitar amb 467 µl de 2-propanol (Baker) prèviament a ser centrifugat a 13000 rpm durant 20 min. El precipitat va ser rentat amb 1 ml d'etanol al 70%, es va sedimentar de nou per centrifugació durant 1 min a 13.000 rpm, es va descartar l'etanol i es va deixar assecar les mostres durant 5 minuts a temperatura ambient. El precipitat obtingut es va resuspendre en Tris-EDTA (TE) i es va deixar tota la nit a 4°C. El pH lleugerament bàsic del tampó TE afavoreix la resuspensió de l'ADN mentre que l'ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) evita l'acció de les DNAses.

Solucions	Composició
Tampó de lisis ADN	100 mM Tris HCl [pH 8.5], 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl
TE	10 mM Tris HCl [pH 8.5], 1 mM EDTA

Taula 1. Composició dels diferents tampons utilitzats en l'extracció d'ADN genòmic.

El volum d' 1 µl d'aquest precipitat genòmic es va incubar amb 19 µl d'una MIX que contenia els elements indispensables perquè es doni la polymerase chain reaction (PCR). La seva composició consta d'un tampó de la reacció 1X, 2mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.1 pmols/ µl dels encebadors *forward* i *revers*, 1U de Taq Pol i aigua destil·lada. Es va afegir la MIX a totes les mostres i es va realitzar l'amplificació amb el termociclador (PTC-100 Peltier thermal Cycler Ref. 084483) previ programació de les condicions per cada cicle de PCR de 5 min a 94°C (inici), 30 segons a 94°C (desnaturalització), 30 segons a 63°C (anellament) i 1 min a 72°C (extensió) durant 35 cicles.

Nom	Casa comercial	Referència	Presentació stock
Proteinasa K	Sigma	P8040	1g
NaCl (Stock)	JTBaker	1764	1kg
Isopropanol	JTBaker	8067	1l
Etanol 100%	JTBaker	8006	1l
TRIS	Amresco	.0497	1Kg
EDTA	VWR (Prolabo)	443885	1Kg
Tampó de reacció 10x	Promega	M190G	10X
MgCl₂	Promega	A351H	25mM

dNTPs	Promega	U1330	100mM
Encebadors	Invitrogen	S5866	100 µM
TAQ polymerase	Biotools	A0164	1000U 5U/µl
Orange G	Sigma	07252	100gr
RedSafe	Intron	.21141	1ml
Top vision Agarose	Fermentas	#R0491	100g

Taula 2. Referències dels diferents components utilitzats tant per a l'extracció d'ADN, com per la PCR i la seva resolució.

Finalment es va suplementar el producte de la PCR amb Orange G (tampó de càrrega d' ADN), es va resoldre en un gel d'agarosa al 2.4 % que contenia l'agent intercalant Redsafe (1:20.000), i es va capturar la imatge al visualitzador de gels (Syngene gene genius SYDR2/1905).

2.2 Genotipatge

El procediment i protocol per genotipar va ser exactament el mateix que l'explicat anteriorment amb la diferència que les mostres procedien de les cues dels ratolins després de ser deslletats, o de les cues dels embrions a dia E15.5 obtinguts en el moment de realitzar els cultius. També aquesta estratègia divergeix respecte l'altre ja que s'utilitzaren 2 sets de primers: un que amplifica la mutació (P1: GGA ACT TAC TCT GTA GAC CAG GCT G i P2: 5'-GAC GTG TCC TAA TAC TAC CAC AAG TGG C) i l'altre set que amplifica el gen de la Cre recombinasa (Cre F: 5' AAA TGG TTT CCC GCA GAA CC 3' Cre R: 5' TAG CTG GCT GGT GGC AGA TG 3') (Bayascas et al., 2006a).

3. Cultiu primari de neurones de ratolí

3.1 Generació del cultiu primari de neurones

Els cultius primaris de neurones es varen obtenir a partir d'embrions PDK1^{+/-} Cre⁻, PDK1^{+/-} Cre⁺, PDK1^{-/-} Cre⁻ i PDK1^{-/-} Cre⁺ a dia E15.5. Primerament, es va tallar un tros de cua de cadascun dels embrions pel posterior genotipat i es varen deixar els embrions en phosphate buffered saline (PBS 1X) en plaques de 100 mm (BD falcon Ref 353004), on es va procedir a la seva dissecció.

Solucions	Composició
PBS 1X	10% PBS 10X (Sigma), 30 mM glucosa, 100.000 unitats de penicil·lina/ 100 mg estreptomina, aigua destil·lada
Krebs Ringer Buffer 10X	1.2 mM NaCl, 48 mM KCl, 12 mM KH ₂ PO ₄ , 250 mM NaHCO ₃ , 143 mM glucosa
Krebs Ringer Buffer 1X	10% Krebs Ringer Buffer 10X en aigua destil·lada
MgSO₄·7H₂O stock	150 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O en aigua destil·lada
CaCl₂·2H₂O stock	81,6 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O en aigua destil·lada

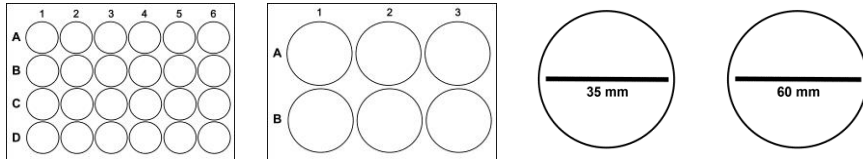
Taula 3. Tampons i reactius bàsics de cultius. Descripció de la composició de les diverses solucions usades en cultius primaris de neurones.

Primer de tot es varen decapitar els embrions, se'ls extragué el cervell, es va lliurar de les meninges per evitar que el cultiu es contaminés de fibroblasts i es va separar l'àrea cerebral d'interès, en el nostre cas còrtex i hipocamp depenent de l'experiment que volíem realitzar. A continuació es va incubar les mostres diseccionades de cada embrió amb la solució 1 per posteriorment ser centrifugades a 1500 rpm durant 30 segons. Després de la centrifugació, el sobrenedant va ser descartat i el pellet obtingut es va incubar amb la solució 2 durant 10 minuts a 37°C; aquesta solució conté tripsina, que permet la disgregació enzimàtica de les cèl·lules del teixit. La digestió enzimàtica va ser parada al afegir la solució 4, que conté inhibidor de tripsina i DNAsa per acabar d'ajudar a disgregar la massa cel·lular. L'homogenat neuronal va ser centrifugat durant 30 segons a 1500 rpm i en acabar, es va descartar el sobrenedant. El precipitat neuronal es va resuspendre amb la solució 3, es va disgregar mecànicament amb una pipeta *pasteur*, la suspensió neuronal resultant es va filtrar amb una malla de *nylon* de 40 µm de diàmetre i es va afegir a la solució 5 per ser posteriorment centrifugada durant 5 minuts a 1000 rpm. Es va descartar el sobrenedant, es varen resuspendre les neurones en medi complet de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) temperat prèviament a 37°C i es va quantificar la suspensió neuronal amb el contador automàtic Scepter™ Handheld Automated Cell Counter amb puntes de 60 µm de diàmetre. Les neurones van ser diluïdes en medi complet de DMEM fins a obtenir la concentració de sembra desitjada: en el cas de les neurones hipocampals, 75.000 cèl·lules/ml i en el de les corticals, 200.000 cèl·lules/ml.

Les dilucions neuronals es varen sembrar en les corresponents plaques, tractades prèviament amb la concentració adequada de poly-D-lisina i temperades a 37°C, en funció de l'experiment a realitzar, i entre les 2-4 hores es va substituir el DMEM per medi complet de NB a fi que es diferenciessin els precursors neuronals.

Solucions	Composició
1	50 ml Krebs 1X, 0.3% BSA (Sigma), 1.2 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O
2	10 ml solució 1, 0.25 mg/ml tripsina
3	10 ml solució 1, 0.8 mg DNasa, 0.52 mg/ml d'inhibidor de tripsina, 1.5 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O
4	8.4 ml solució 1, 1.6 ml solució 3
5	5 ml solució 1, 1.2 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.01 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O

Taula 4. Solucions de cultius primaris de neurones. Descripció de la composició de les diverses solucions usades en el procés d'obtenció d'una suspensió de neurones embrionàries a partir de les àrees cerebrals disseccionades.



Volums	35 mm	60 mm
Sembra	0.5 ml	2 ml
Tractament	0.4 ml	
Rentats PBS 1X	0.5 ml	2 ml
Deprivació		1 ml
Canvi NB complet	0.5 ml	2-2.5 ml
Poli-D-lisina (corticals)	50 µg/µl	50 µg/µl
Poli-D-lisina (hipocampals)	150 µg/µl	150 µg/µl

Taula 5. Esquema dels tractaments de les diferents plaques de cultiu. Descripció dels diferents volums aplicats de sembra, de rentats, de canvi de medi, de tractament i de poli-D-lisina.

3.2 Tractaments dels cultius primaris

Les plaques sembrades amb neurones corticals destinades a experiments de supervivència varen ser doblement rentades amb DMEM sense sèrum a DIV6 i incubades durant 24 hores en les diferents condicions. Els tractaments control consistien en dos rentats de DMEM sense sèrum i el medi condicionat era llavors retornat als respectius pous. La deprivació tròfica consistia en incubar les neurones en medi neurobasal (NB) sense sèrum, mentre que el rescat d'aquesta situació es va realitzar incubant les neurones amb NB sense sèrum suplementat amb 50 ng/ml de brain derived neurotrophic factor (BDNF, Alomone labs, #B-250). Els diferents inhibidors descrits a la Taula 7 varen ser diluïts en dimethyl sulfoxide (DMSO) i incubats amb neurones en NB sense sèrum i 50 ng/ml de BDNF a les concentracions indicades. Les neurones avaluables pels diferents processos de diferenciació es varen incubar amb els inhibidors diluïts en medi complert de NB dos hores després de la seva sembra.

Medis	Composició
DMEM sense sèrum (1)	2 mM L-Glutamina, 25000 unitats penicil·lina, 25 mg estreptomicina i DMEM (Sigma #D5796)
DMEM complert (1)	2 mM L-Glutamina, 25000 unitats penicil·lina, 25 mg estreptomicina, 10% FBS (Gibco #10270) i DMEM (Sigma #D5796)
DMEM sense serum (2)	25000 unitats penicil·lina, 25 mg estreptomicina, 10% FBS i DMEM GlutaMax (Gibco #31966-021)
DMEM complert (2)	25000 unitats penicil·lina, 25 mg estreptomicina, 10% FBS i DMEM GlutaMax (Gibco #31966-021)
NB sense sèrum	2 mM L-glutamina, 25000 unitats penicil·lina, 25 mg estreptomicina a i Neurobasal Gibco (#21103)
NB complert	2 mM L-glutamina, 25000 unitats penicil·lina, 25 mg estreptomicina, 2% B27 (Gibco 17504) i Neurobasal Gibco (#21103)

Taula 6. Medis de creixement i diferenciació neuronal. Descripció de la composició dels diferents medis utilitzats pel creixement i tractament del cultius primaris de neurones.

Els diferents cultius primaris destinats a experiments de *western blot* eren deprivats durant 4 hores amb DMEM sense sèrum i tractats amb els corresponents inhibidors 30 minuts abans d'estimular-los amb BDNF durant els temps indicats.

Nom	Inhibidor	Referència	Dosi tractament (µM)
GSK2334470	PDK1	Sigma (SML0217)	0.1, 1, 2 i 10
PF4708671	S6K	Axon Medchem (1602)	1, 3, 5 i 10
GSK650394	SGK	Axon Medchem (1570)	0.1, 0.5, 1 i 10
BI-D1870	RSK	Axon Medchem (1528)	10
Akt-i-1/2	PKB	Calbiochem (124018)	1
AZD8055	mTORC2	Axon Medchem (1561)	0.3
Rapamycin	mTORC1	Calbiochem (553210)	0.1
PI-103	PI3K	Calbiochem (528100)	1

Taula 7. Referència dels diferents inhibidors de la via de la PI3K. Especificació de la quinasa que inhibeix, la referència i les dosis utilitzades en els diferents experiment.

3.3 Avaluació de la supervivència i mort neuronal

3.3.1 Assaig per MTT de la viabilitat neuronal

Aquest mètode colorimètric basat en el reactiu 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide salt (MTT, Sigma #M2128) permet avaluar el metabolisme neuronal com a referència de la viabilitat cel·lular. Els cultius primaris de neurones corticals varen ser incubats durant 45-60 minuts a 37 °C i 5% de CO₂ amb 0.5/mg/ml de reactiu d'MTT. En aquest transcurs de temps l'MTT va ser reduït a cristalls porpres i insolubles de formazan per les reductases presents en les mitocondries neuronals. Els cristalls de formazan van ser resuspesos en 300 µl de DMSO tot generant una solució violeta, l'absorbància de la qual va ser mesurada amb l'espectrofotòmetre Synergy HT. Els valors d'MTT s'obtenien de la diferència entre l'absorbància del medi obtinguda a 560 nm i de la placa mesurada a 620 nm, i es referiren al control, que representa el 100% de la viabilitat neuronal.

3.3.2 Quantificació de l'apoptosi neuronal

Les neurones varen ser fixades amb un 2% de paraformaldehid (PFA) i tenyides amb 1 µg/µl de colorant nuclear Hoechst 33342. El mostreig d'imatges corresponent a la morfologia nuclear neuronal va ser obtingut amb el microscopi Nikon Eclipse TE2000-E de 6 camps diferents per pou i 4 pous per cada condició. Les diferents morfologies nuclears varen ser comptades i classificades amb el *plugin cell counter* de ImageJ 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health).

4. Generació dels extractes proteics

4.1 Extractes proteics procedents de cultiu primari de neurones

Els cultius primaris de neurones varen ser cultivats a diferents dies *in vitro* en funció de l'experiment i abans de lisar-los es varen rentar amb PBS 1X o deprivar amb medi DMEM sense sèrum i estimulats amb l'agonista corresponent. Immediatament després, les neurones es varen lisar a 4°C en 50 o 100 µl de tampó de lisis fred en funció del nombre de cèl·lules sembrades. Amb una rasqueta s'obtingué una suspensió de neurones que va ser transferida en *ependorfs* i es va deixar lisant durant 30 minuts a 4°C, per llavors ser centrifugada a la mateixa temperatura durant 10 minuts a 13.000 rpm. El sobrenedant, que conté l'extracte proteic, va ser transferit en un nou *ependorf* i la mostra es va preservar a -20°C, mentre el *pellet* on es troben les restes cel·lulars va ser descartat.

Solucions	Composició
Tampó de lisis stock	1 mM EDTA, 1 mM EGTA 1 mM ortovanadat sòdic, 50 mM fluorat sòdic, 5 mM pirofosfat sòdic, 10 mM beta glicerofosfat sòdic, 0.27 M sucrosa.
Tampó de lisis suplementat	1% de Tritó X-100, 0.1% de 2-mercaptoetanol i 1% d'inhibidors de proteases (Sigma, #8340), tampó de lisis

Taula 8. Composició dels tampons utilitzats pel procés d'obtenció del lisat proteic.

4.2 Extractes proteics procedents de teixits

Els diferents teixits varen ser disgregats mecànicament amb l'homogeneïtzador Polytron 10674 Kinematica GmbH o amb la Pellet pestle Motor (Z359971-1EA) en 10-20 volums/pes de tampó de lisis suplementat a 4°C. Es deixà actuar la solució de lisis en la massa de teixit disgregat durant 30 minuts en gel, i es centrifugà a 13.000 rpm durant 10 minuts a la mateixa temperatura.

Les concentracions de proteïna dels diferents extractes proteics s'obtenien extrapolant les absorbàncies obtingudes pel mètode colorimètric de Bradford (Coomassie protein assay reagent, Pierce #23200), amb l'espectrofotòmetre LKB Novaspec 2 Biochrom, a partir d'una recta patró de concentracions conegudes d'albumina sèrica bovina (BSA).

5. Western Blotting

5.1 Electroforesi en gels SDS-PAGE

Quantitats equivalents de proteïna dels diferents lisats cel·lulars es varen diluir en tampó de càrrega 4X (concentració final:1X) i se'ls va fer un xoc tèrmic a 95°C durant 5 minuts. Les mostres es varen carregar en gels de polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) prèviament preparats, juntament amb el marcador proteic de pes molecular (10-250 KDa) de Bio-Rad (#161-0373). La concentració d'acrilamida del gel es va triar en funció del pes molecular de la proteïna que volíem resoldre. Els extractes proteics es separaren per electroforesi a través de l'entramat d'acrilamida, tot mantenint un voltatge fix de 160 V durant 60-100 minuts.

Solucions	Composició
Tampó d'electroforesi 1X	25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0.1% SDS, aigua destil·lada
Tampó de càrrega 4X (Stock)	125 mM Tris-HCl [pH6.8], 40% glicerol, 8% SDS, 0.01% Bromophenol blue, aigua destil·lada
Tampó de càrrega mostres	Tampó de càrrega 4X, 10% β -mercaptoetanol
10% APS	1 g APS en 10 ml aigua destil·lada
20% SDS	20 g SDS en 100 ml aigua destil·lada

Taula 9. Tampons i reactius d'electroforesi. Descripció de la composició de les diverses solucions usades en el procés d'electroforesi, preparació de mostres i gels.

Solucions	GEL SEPARADOR						GEL APILADOR	
	5%	6%	7.5%	10%	12.5%	15%	5%	3.6%
Aigua destil·lada	11.6 ml	10.5 ml	10 ml	8.3 ml	7 ml	5 ml	3.8 ml	4 ml
30% Acryl.0.8 bis	3.4 ml	4 ml	5 ml	6,7 ml	8 ml	10 ml	850 µl	600 µl
0,5M Tris [pH 6,8]							325 µl	325 µl
1,5M Tris [pH 8,8]	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml		
20% SDS	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	25 µl	25 µl
10% APS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	50 µl	50 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	5 µl	5 µl

Taula 10. Gels SDS-PAGE. Taula on es mostren els reactius i els volums necessaris per elaborar els gels separadors i apiladors amb el seu corresponent percentatge d'acrilamida en funció de la proteïna a resoldre. sodium dodecyl sulphate (SDS); N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED); ammonium persulfate (APS).

5.2 Transferència i detecció proteica en membranes de nitrocel·lulosa

Els gels que requerien la detecció de les mateixes proteïnes eren tallats seguint el marcador de pes molecular i transferits, en les mateixes condicions i seguint el muntatge descrit en la Fig.53, en membranes de nitrocel·lulosa que eren activades prèviament amb el tampó de transferència. Els extractes proteics varen ser transferits a les corresponents membranes en tampó de transferència i en unes condicions fixades de 100 V durant 90 minuts i a 4°C. L'excés de buffer de transferència va ser eliminat de les membranes amb aigua destil·lada, es va procedir a verificar la presència de proteïna amb la tinció reversible de *Ponceau S* (Sigma P7170) i després d'eliminar el colorant amb rentats en aigua destil·lada es varen bloquejar les membranes durant 40 minuts en una solució de llet al 10% en TBS-Tween a fi d'evitar les interaccions inespecífiques dels anticossos. Després del bloqueig, les membranes es rentaren amb solució TBS-Tween i s'incubaren durant tota la nit a 4°C amb els anticossos corresponents i les dilucions establertes en la Taula 12.



Figura 53. Transferència proteica. Esquema representatiu de muntatge dels gels i les membranes de nitrocel·lulosa previ al procés de transferència proteica amb el Miniprotean Kit de Bio-Rad.

L'excés d'anticòs primari va ser eliminat de les membranes fent 3 rentats de 5 minuts en solució de TBS-Tween, que a continuació s'incubaren amb el corresponent anticòs secundari conjugat a la peroxidasa de rave i a la dilució establerta en llet al 5% en TBS-Tween durant 45 minuts a temperatura ambient. Aleshores l'excés d'anticòs secundari va ser eliminat mitjançant 3 rentats de 10 minuts amb una solució de TBS-Tween i es va aplicar sobre les membranes la solució enhanced chemiluminescence reagents (ECL) durant 1 minut. Aquesta solució permetia la reacció quimioluminiscent, basada en peroxidasa que conté l'anticòs secundari, i la consegüent detecció de les corresponents proteïnes en films de radiografia (Super RX Fujifilm) revelats automàticament amb el GeneGnome HR detection system (Syngene, Cambridge, United Kingdom).

Solucions	Composició
Tampó de transferència 1X	25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol, aigua destil·lada
TBS-Tween (Rentats)	TBS 1X, 0.2% Tween 20, aigua destil·lada
Bloqueig	10% llet en pols desnatada, solució TBS-Tween
ECL (Mix ECL1 i ECL2)	ECL1: Tris HCL 0.1M [pH:8.5], 2.5 M luminol, 396 mM àcid coumàric, aigua destil·lada ECL2: Tris HCL 0.1M [pH:8.5], H ₂ O ₂ 2,82 M, aigua destil·lada

Taula 11. Tampons i reactius de la transferència. Descripció de la composició de les diverses solucions usades en el procés de transferència i detecció proteica.

6. Purificació per afinitat de PDK1

La purificació per afinitat de PDK1 aprofita l'especificitat d'un pèptid biotinilat (Biotin-C6 spacer-REPRILSEEEQEMFRDFAYIADWC) que emula el *docking site* dels substrats de PDK1 i per tant interacciona amb la quinasa en qüestió. El pèptid biotinilat es va conjuguar a una resina d'estreptavidina-sefarosa (GE Healthcare), que va ser rentada prèviament a 4°C en agitació durant 30 minuts amb un tampó de lisis suplementat amb 150 mM NaCl, a fi d'eliminar elements que poguessin causar una inespecificitat en la detecció proteica. Els corresponents lisats, amb un contingut de 300 µg de proteïna, van ser incubats amb 10 µl de la resina conjugada, que contenia 0.5 µg de pèptid biotinilat, durant 1 hora en agitació i a 4°C. Les suspensions proteiques van ser centrifugades a 13.000 rpm en les mateixes condicions de temperatura i es va descartar el sobrenedant que contenia tot allò que no havia unit específicament al pèptid. El *pellet* obtingut va passar per tres rondes de rentats amb el tampó descrit anteriorment per eliminar possibles interaccions inespecífiques, i les mostres es van preparar amb el tampó de càrrega i detectar amb l'anticòs anti-PDK1 per *Western Blot*.

7. Anticossos

Els anticossos descrits a continuació varen ser cedits pel Dr. Dario Alessi de la Universitat de Dundee. Tots els anticossos varen ser obtinguts d'ovelles i purificats per afinitat al corresponent antigen. L'anticòs contra la proteïna total de PKBα reconeix la seqüència RPHFPQFSYSASGTA, corresponent a la regió entre els residus 466 i 480 de la proteïna PKB de rata; l'anticòs contra la proteïna total de TSC2 reconeix la regió entre els residus 1719 to 1814 de la proteïna TSC2 de ratolí; l'anticòs contra la proteïna total de PRAS40 reconeix la seqüència DLPRPRLNTSDFQKLKRKY, corresponent a la regió entre els residus 238 i 256 de la proteïna PRAS40 d'origen humà i els anticossos contra les proteïnes totals de FoXO i NDRG1 reconeixen les proteïnes recombinants d'aquestes dues quinases expressades en *Escherichia coli*. L'anticòs contra la proteïna total LKB1α reconeix la seqüència GELMSVGMDFIHRID, corresponent a la regió entre els residus 15 i 30 de la proteïna LKB1 de ratolí

(Sapkota et al., 2001); mentre que els anticossos policlonals contra BRSK1 i BRSK2 varen ser purificats per afinitat al pèptid SPRRGPPKDKKLLATNGTPLP, corresponent a l'extrem C-terminal de la quinasa BRSK1 human que inclou els residus del 774 al 794; i al pèptid LSWGAGLKGQKVATSYESSL, corresponent a la regió que avarca els residus del 655 al 674 de la proteïna BRSK2 humana (Rodríguez-Asiain et al., 2011). La resta d'anticossos es descriuen en la Taula 12 i van ser detectats amb els corresponents anticossos secundaris descrits en la Taula 13.

Anticossos primaris	Referència	Espècie	Dilució/Diluent
TrKB (Y706/Y707-P)	CST (#4621)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
TrKB (Total)	CST (#4603)	conill	1:1000/ 5% BSA
PDK1 (Total)	CST (#3062)	conill	1:1000/ 5% BSA
PKB (T308-P)	CST (#9275)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
PKB (S473-P)	CST (#9271)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
PRAS40 (T246-P)	CST (#2997)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
TSC2 (T1462-P)	CST (#3611)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
GSK3 α/β (S9/S21-P)	CST (#9331)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
GSK3 α/β (Total)	Santa Cruz (sc-7291)	ratolí	1:1000/ 5% BSA
FoxO1/FoxO3a (T24/T32-P)	CST (#9464)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
FoxO1 (Total)	CST (#2880)	conill	1:1000/ 5% BSA
S6K (S389-P)	CST (#9205)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
pan-PKC γ (T514-P) o S6K (T229-P)	CST (#9379)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
S6K (Total)	CST (#9202)	conill	1:1000/ 5% BSA
S6 (S235-P)	CST (#2211)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
S6 (Total)	CST (#2217)	conill	1:1000/ 5% BSA
ERK 1/2 (Y202/Y204-P)	CST (#9101)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
ERK 1/2 (Total)	CST (#9102)	conill	1:1000/ 5% BSA
RSK (T573-P)	CST (#9346)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
RSK (S380-P)	CST (#9335)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
RSK (S227-P)	Santa Cruz (sc-12445)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
RSK (Total)	CST (#9355)	conill	1:1000/ 5% BSA
NDRG1 (T346-P)	CST (#5482)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
mTORC1 (S2448-P)	CST (#5536)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
mTORC1 (S2481-P)	CST (#2974)	conill	1:1000/ 0.5% BSA

FRAP (N-19)/ mTOR (Total)	Santa Cruz (sc-1549)	cabra	1:1000/ 5% llet
ULK (S757-P)	CST (#6888)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
ULK1 (R600) (Total)	CST (#4773)	conill	1:1000/ 5% BSA
LKB1 (S431-P)	Santa Cruz (sc-28465)	conill	1:1000/ 0.5% BSA
Synaptophysin (Total)	Sigma (S-5768)	ratolí	1:100/ 0.5% BSA
Anti-GAD67	Millipore (MAB5406)	ratolí	1:750/ dtu
Anti-MAP2	Sigma (M3696)	conill	1:300/ dtu
Anti-Tau	Millipore (MAB3420)	ratolí	1:400/ dtu
pan-axonal neurofilament marker	Covance (SMI-312R)	ratolí	1:1000/ dtu
Anti-NeuN	Chemicon (MAB377)	ratolí	1:1000/ dtu
CDP M-222 (CUX1)	Santa Cruz (sc-13024)	conill	1:100/ dtu
Anti-Parvoalbumin (Total)	Millipore (MAB1572)	ratolí	1:500/ dtu
PSD95 (Total)	Abcam (2723)	ratolí	1:500/ dtu

Taula 12. Llistat dels anticossos primaris. Descripció detallada dels diferents anticossos primaris utilitzats en els diferents experiments. Cell signaling technology (CST), monoclonal antibody (MAB), Santa Cruz (sc) i dependent de la tècnica utilitzada (dtu).

Anticossos secundaris	Referència	Espècie	Dilució/Diluent
Anti-Rabbit HRP-conjugated	Thermo (#31460)	cabra	1:2500/ 5% llet
Anti-Mouse HRP-conjugated	Thermo (#31430)	cabra	1:2500/ 5% llet
Anti-Sheep HRP-conjugated	Thermo (#31480)	conill	1:2500/ 5% llet
Anti-Goat HRP-conjugated	Pierce (31133)	conill	1:5000/5% llet
Anti-Rabbit Alexa Fluor 594	Invitrogen (#A11072)	cabra	1:400/ dtu
Anti-Mouse Alexa Fluor 488	Invitrogen (#A11017)	cabra	1:400/ dtu

Taula 13. Llistat dels anticossos secundaris. Descripció detallada dels diferents anticossos secundaris utilitzats en els diferents experiments. Horse raddish peroxidase (HRP) i dependent de la tècnica utilitzada (dtu).

8. Anàlisi morfològic

8.1. Immunocitoquímica

Les neurones hipocampals varen ser cultivades durant els diferents DIV indicats, fixades en 4% de PFA durant 25 minuts, rentades dues vegades amb PBS 1X i preservades a 4°C fins a procedir amb el protocol d'immunocitoquímica.

Les membranes cel·lulars es varen permeabilitzar amb la solució 1 durant 7 minuts, l'excés de detergent va ser eliminat amb la solució de rentat i es va aplicar durant 15 minuts la solució 2, que conté glicina, per evitar que els grups aldehids residuals de la solució de fixació augmentessin el soroll de fons i interferissin en la detecció de la proteïna d'interès. Llavors, les neurones varen ser incubades durant 1 hora amb la solució de bloqueig i posteriorment, amb els anticossos diluïts en la solució 4 a la corresponent concentració durant tota la nit a 4°C.

L'endemà, es va eliminar l'excés d'anticòs primari dels cobreobjectes i s'incubaren amb l'anticòs secundari diluït en la solució 4 durant 90 minuts en absència de llum. Després d'eliminar l'excés d'anticòs secundari amb la solució de rentat, els respectius cobreobjectes s'incubaren amb una solució de Hoechst 1 µg/ml durant 10 minuts, es va eliminar l'excés de colorant nuclear amb PBS 1X i es va procedir al muntatge del cobreobjectes en els portaobjectes amb el medi FluorSave Reagent (Calbiochem #345789).

Solucions	Composició
1	0.02% saponina, PBS 1X
2	0.01% saponina, 10 mM glicina, PBS 1X
Solució de bloqueig	0.01% saponina, 10 mM glicina, 5% BSA, PBS 1X
4	0.01% saponina, 1% NGS, PBS 1X
Solució de rentat	PBS 10X (SIGMA D1418), aigua destil·lada

Taula 14. Solucions protocol immunocitoquímica. Descripció de la composició de les diverses solucions usades en el protocol d'immunocitoquímica.

8.1.1 Avaluació de la diferenciació neuronal

Les diferents cèl·lules hipocampals fixades a diferents days in vitro (DIV) varen ser immunotenyides amb el marcador dendrític MAP2, el marcador axonal Tau1 i el colorant nuclear Hoechst.

Les imatges a 20 augments procedents del canal verd, vermell i blau, varen ser capturades simultàniament amb el microscopi d'epifluorescència Nikon Eclipse 90i connectat a una càmera DXM 1200 F. El nombre i la llargada dels axons, dendrites i les seves ramificacions d'una mitja de 100 neurones escollides

aleatòriament per cada genotip i procedents de 3 cultius de neurones hipocampals independents, varen ser mesurats amb el *plugin* NeuronJ; mentre que el comptatge de les neurones es va realitzar amb el *plugin* Cell Counter del programa ImageJ 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health).

8.2. Perfusió i inclusió dels cervells en parafina

Els ratolins varen ser anestesiats intraperitonealment amb una dosi letal de pentobarbital sòdic proporcional al seu pes (0.4 mg/g pes). Posteriorment, se'ls va injectar intracardíacament 70 µl d'una solució d'heparina a fi d'evitar la coagulació de la sang, i així facilitar la perfusió dels animals primer amb una solució salina i després amb una solució de paraformaldehid (PFA) al 4% per fixar les estructures internes.

Llavors es va procedir a extreure els cervells, fixar-los externament amb la mateixa solució de perfusió de PFA durant 2 hores, eliminar-los l'excés de PFA amb paper secant i preservar-los a 4°C en una solució d'etanol al 70% fins que els diferents cervells varen ser inclosos en el mateix bloc de parafina.

Sis encèfals de ratolins adults es varen incloure en el mateix bloc de parafina seguint el protocol estàndard amb l'inclusor Leica TP1020 i es varen obtenir seccions coronals de 5 µm de gruix amb el micròtom Leica RM2255.

Solucions	Composició
Salina	0.9% NaCl (9 gr NaCl en 1L d'aigua destil·lada)
Heparina	Heparina 1000 unitats/ml (dilució 1/5 de l'stock 1:5000 en 0.9% NaCl)
Pentobarbital	0.4 mg/g (33.33 µl stock [12 mg/ml] * pes (grams) ratolí en 0.9% NaCl)

Taula 15. Solucions protocol de perfusió. Descripció de la composició de les diverses solucions usades en el procés de perfusió.

8.3. Tinció hematoxil·lina-eosina (H-E)

Les mostres varen ser desparafinades seguint el procediment de la Fig.56, i tenyides amb el colorant nuclear bàsic hematoxilina i amb el colorant citoplasmàtic àcid eosina seguint el procés descrit en la Fig.54. Aquest protocol es repeteix fins aconseguir el contrast adequat entre els dos colorants i per això

s'utilitzà l'alcohol àcid per eliminar l'excés d'eosina, que és el colorant més saturant.



Figura 54. Esquema on es descriuen els diferents passos de la tinció H-E.

Un cop les mostres es varen tenyir amb la tinció H-E, es deshidrataven seguint el procediment descrit a la Fig.55, muntaven amb el medi hidrofòbic Di-n-butyl phthalate (DPX), es varen segellar amb un cobreobjectes i guardar a temperatura ambient.

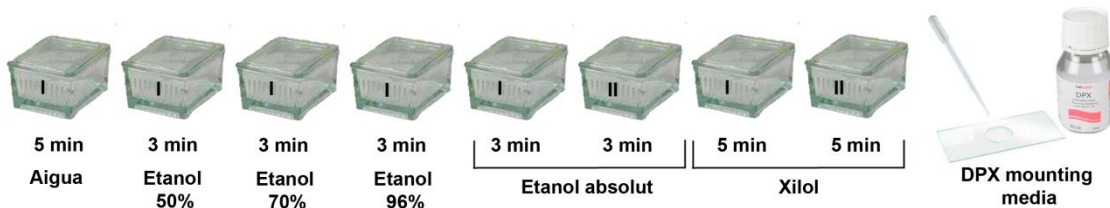


Figura 55. Procés de deshidratació i muntatge de la mostres tenyides amb H-E.

8.4. Immunohistoquímica

Les diferents seccions incloses en parafina es varen escalfar durant 2 hores a 60°C per eliminar l'excés de parafina i varen ser rehidratades al passar-les per un banc de solucions de diferents graus d'hidrofobicitat (xilol, 100% etanol, 96% etanol, 70% etanol, 50% etanol i aigua destil·lada) descrit en la Fig.56. Per exposar els epitops proteics que poguessin restar emmascarats com a conseqüència de la solució de fixació, les mostres varen ser incubades durant 8 minuts en una solució de citrat en ebullició, es deixaren refredar durant 30 minuts en gel, i la solució de citrat va ser eliminada amb tres rentats d'un tampó de Tris-buffered saline (TBS 1X). Llavors, per evitar la interacció entre proteïnes i facilitar la seva detecció, es varen bloquejar les mostres amb la solució 1 durant 30 minuts i es deixaren tota la nit a 4°C amb el corresponent

anticòs diluït amb la mateixa solució. L'endemà les seccions varen ser rentades amb el tampó TBS 1X, incubades durant 1 hora i 30 minuts amb el corresponent anticòs secundari Alexa fluor 488 o 594 (el número indica la longitud d'ona d'emissió del fluorocrom conjugat a l'anticòs) diluït amb la mateixa solució, i tenyides amb el colorant nuclear Hoechst abans de ser muntades amb el medi hidrofílic Fluorsave Reagent (Calbiochem #345789)..

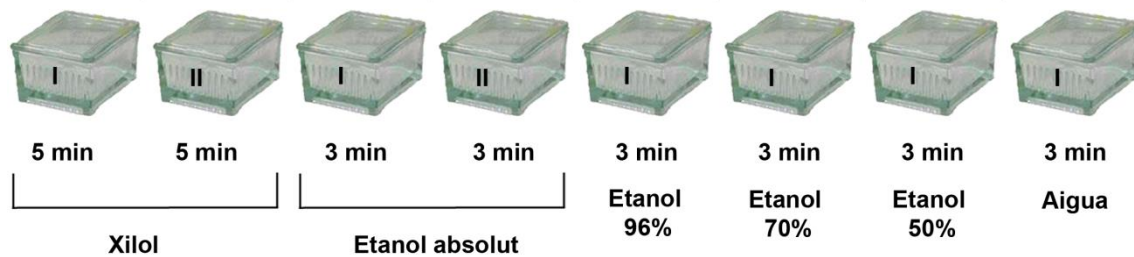


Figura 56. Procés d'hydratació de les mostres incloses en parafina.

Les imatges de fluorescència procedents de les diferents seccions varen ser captades amb el microscopi d'epifluorescència 90i Nikon Eclipse i processades amb els *softwares* ImageJ 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health) i Fiji (http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Main_Page).

Solucions	Composició
TBS 10X	250 mM Tris [pH7.5], 1.5 M NaCl, aigua destil·lada
TBS 1X	25 mM Tris [pH7.5], 150 mM NaCl, aigua destil·lada
Solució 1	TBS 1X, 0.02% Tritó X-100, 5% NGS
Hoechst	TBS 1X, 0.02%Tritó-X100, 1µg/ml Hoechst

Taula 16. Solucions protocol immunohistoquímica. Descripció de la composició de les diverses solucions usades en el protocol d'immunohistoquímica.

8.4.1 Quantificació de la immunohistoquímica

3 imatges independents de cada genotip immunotenyides amb CUX1 o GAD67 varen ser analitzades amb les eines corresponents del programa Fiji (http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Main_Page).

El nombre de neurones glutamatèrgiques es va mesurar, sobre la imatge binària procedent de les corresponents mostres marcades amb CUX1, amb

l'*Analyse particle tool* sota uns criteris de diàmetre nuclear i circularitat predeterminats. La proporció i l'àrea representada per les neurones marcades amb CUX1 que es troben delimitades en la region of interest (ROI) corresponent a la quarta capa del còrtex somatosensorial respecte la ROI representativa de les capes superiors del còrtex va ser analitzada i representada com al percentatge de neurones presents a la quarta capa del còrtex. D'altra banda, per determinar la densitat cel·lular, vàrem avaluar el nombre de neurones presents en la quarta capa del còrtex respecte l'àrea que representava la regió que ocupaven ((cell density (cel/ μm^2)).

El soroll de fons de les imatges marcades amb GAD67 va ser eliminat delimitant els nivells inferiors del *threshold* als valors obtinguts d'una regió de la imatge inespecífica pel marcador utilitzat i que ens servís de referència pel soroll de fons; mentre que els nivells superiors s'ajustaven a 255, responent al màxim nivell de grisos. La intensitat de GAD67 va ser quantificada a partir de la densitat integrada analitzada amb el *plugin measure tool* del programa Fiji.

9. Anàlisi de la conducta

Un protocol d'experiments estandarditzat anomenat SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell, MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit; Imperial College School of Medicine at St Mary's; Royal London Hospital, St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment (SHIRPA) va ser utilitzat per caracteritzar el fenotip conductual dels corresponent genotips del nostre model murí (Rogers et al., 1997). Una primera aproximació a aquest protocol va ser l'observació de la conducta que desenvolupaven en la gàbia on residien, tot valorant paràmetres com la seva sociabilitat, el *barbering* i les conductes de dormir en grup. Les tasques sensorimotors basades en la coordinació motora i l'equilibri es varen representar com la distància recorreguda i la latència a caure d'una barra de fusta horitzontal de 1.3 cm d'amplada i d'una tela metàl·lica d' 1 cm de diàmetre, realitzades en dos assajos consecutius de 20 segons. La premsabilitat i la coordinació motora va ser mesurada en el wire hang test, com la distància recorreguda escalant la tela metàl·lica en dos assajos de 5 segons i un tercer de 60 segons. En aquest últim, s'aprofitava per valorar la força

muscular basada en el temps que tardaven els ratolins en caure de la tela. Les aptituds de nidificació varen ser avaluades, segons l'escala de 5 punts de Deacon, en els diferents ratolins per separat usant paper de bany (Deacon, 2006). El segon i el tercer bloc de procediments experimentals relatius al mètode SHIRPA examina els dèficits neuropsiquiàtrics analitzant la conducta exploratòria espontània, l'ansietat, alteracions en els ritmes circadians i la cognició a través de diferents test que comprenen diversos nivells de complexitat. La neofòbia era avaluada en la prova del corner test registrant l'activitat horitzontal (nombre de vegades que visitava les cantonades del recinte) i vertical (nombre de vegades i latència de temps a aixecar-se o altrament dit, fer *rearings*) del ratolí en una gàbia nova i durant 30 segons. L'activitat exploratòria i l'ansietat varen ser examinades en el test estàndard de l'Open Field durant 10 minuts, on a cada minut es registrava l'activitat locomotora horitzontal (cm recorreguts) i la vertical (nombre de *rearings*). També el *freezing* o paralizació (latència de temps a iniciar-se el moviment), la *thigmotaxis* (latència de temps dels ratolins a abandonar el quadrant central i entrar en la zona perifèrica delimitada a 10 cm de les parets del recinte), l'empolainament o *self-grooming* (latència, nombre i duració dels *groomings*) i la freqüència de defecació així com d'urinació varen ser mesurades. El marble-burying test es va realitzar en caixes estàndard que contenien 10 bales (mesures de les bales: 1cm x 1cm x 1cm) separades entre elles per una línia de serradures de 5 cm de gruix. En la prova es mesurava la latència de temps dels ratolins a tenir contacte amb les bales al llarg dels 30 minuts que durava l'experiment, així com també l'avaluació de l'estat d'enterrament de les bales segons els següent criteri: intactes (nombre de bales sense manipular), canviades de posició (nombre de bales, com a mínim, semienterrades o rotades 90-180°) i enterrades (nombre de bales completament enterrades en les serradures) (Torres-Lista and Giménez-Llort, 2013). Finalment, la memòria a curt termini, a llarg termini i l'espacial varen ser examinades en la prova del Water maze durant 3 dies. Al primer dia, els diferents ratolins varen ser entrenats segons el criteri basat en què el 90% dels animals aconseguissin arribar a la plataforma senyalitzada (7cm de diàmetre, 1 cm exposada per sobre de l'aigua i la seva posició referenciada per una bandera esquinçada de

5 x 8 cm) ubicada en una piscina (Intex Recreation Corp. CA, USA; 91 cm de diàmetre i 40 cm profunditat que contenia aigua atemperada a 25°C) i en menys de 60 segons al llarg dels diferents assajos realitzats que es trobaven espaiats per 20 minuts de temps. Els ratolins que no varen aconseguir arribar a la plataforma abans del temps establert eren manualment guiats fins a la plataforma i se'ls hi deixava durant 5-10 segons (el mateix temps que hi residien els animals que hi havia arribat amb èxit). D'altra banda, cada assaig es referenciava com a cue visible platform trial (CUE) on el CUE4 representa l'últim lloc de posthabitució dels ratolins en els assajos amb la plataforma visible, realitzats abans de començar l'experiment. L'experiment es repetia 24 i 48 hores després però canviant la ubicació de la plataforma i submergint-la 1.5 cm sota l'aigua opaca (platform trials 1-4 (PT1-PT4)). El temps que tardaven a trobar la plataforma va ser mesurat i el temps de flotació varen ser mesurats amb un cronòmetre. L'activitat locomotora associada al ritme circadià del ratolí va ser avaluada durant 84 hores consecutives, equipant la gàbia on residien amb una roda connectada a un sensor que mesurava l'actimetria en valors de nombre de voltes completes realitzades (García-Mesa et al., 2011).

10. Anàlisi estadístic

La relació entre les diferents variables experimentals va ser valorada mitjançant l'anàlisi de la variància aplicada a través del test de l'ANOVA d'un o més factors en funció de l'experiment. La comparació entre els diferents grups es va realitzar amb els Bonferroni *post-tests* i els valors que vàrem considerar com a significatius responien a una $P < 0.01$ (*) i $P < 0.001$ (**). Tot l'anàlisi estadístic va ésser realitzat amb el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTATS

1. Generació del ratolí *knockin* condicional PDK1 L155E de sistema nerviós central

A fi de superar la letalitat embrionària que comportava la inhabilitació del PIF-pocket de PDK1, es va utilitzar l'estratègia del *minigene* per dirigir l'expressió de la proteïna mutant de PDK1 al sistema nerviós central. Aquesta estratègia consisteix en el disseny d'un constructe que compren la regió de l'exó 2 al 4 del gen de PDK1 i que inclou la mutació de la leucina 155 a àcid glutàmic en l'exó 4. A més a més, s'insereix entre els exons 2 i 3 un *minigene* que consisteix en la pauta oberta de lectura de PDK1 des de l'exó 3 al 14 i que acaba amb una seqüència forta de finalització de la transcripció. El fet que el *minigene* estigui flanquejat per seqüències LoxP de reconeixement de la Cre-Recombinasa permet que en condicions basals el transgen s'expressi a partir dels dos primers exons del locus endogen de PDK1 i del *minigene*, donant lloc a la proteïna salvatge, mentre que l'excisió del *minigene* mediada per la Cre-Recombinasa resulta en l'expressió de la proteïna mutant (Fig.57A). Per simplicitat de nomenclatura anomenaré l'alel condicional com a PDK1⁻ i l'alel salvatge endogen com a PDK1⁺. Com es veurà, la seqüència finalitzadora de la transcripció no va resultar prou eficient com per impedir que s'expressés la proteïna mutant de PDK1 en absència de la Cre-Recombinasa, i com a conseqüència es varen generar unes sèries al·lèliques de quantitats creixents de proteïna mutada. Aquest ratolins varen ser desenvolupats prèviament pel Dr. José Ramón Bayascas sota la supervisió del professor Dario Alessi de la Universitat de Dundee (Bayascas et al. , 2006).

Els ratolins homozigots per l'alel condicional de PDK1 (PDK1^{-/-}) es varen creuar amb ratolins que expressaven la Cre-Recombinasa sota el control de l'enhancer del promotor neuronal del gen de la nestina, que dirigeix l'expressió de l'alel condicional a partir de E10.5 en precursors tant de neurones com de glia.

Els ratolins PDK1^{-/-}Cre⁺, però també els PDK1^{-/-}Cre⁻, que expressen de forma basal elevats nivells de proteïna mutada als diferents teixits; són viables, fèrtils i presenten una reducció del 20% en el pes respecte els ratolins control que mantenen com a mínim una còpia de l'alel salvatge de PDK1 (Fig.80A). D'altra

banda, els ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{+}$, a diferència dels $PDK1^{-/-}Cre^{-}$, presenten una freqüència Mendeliana reduïda tant a E15.5 com en el naixement (Fig.57B).

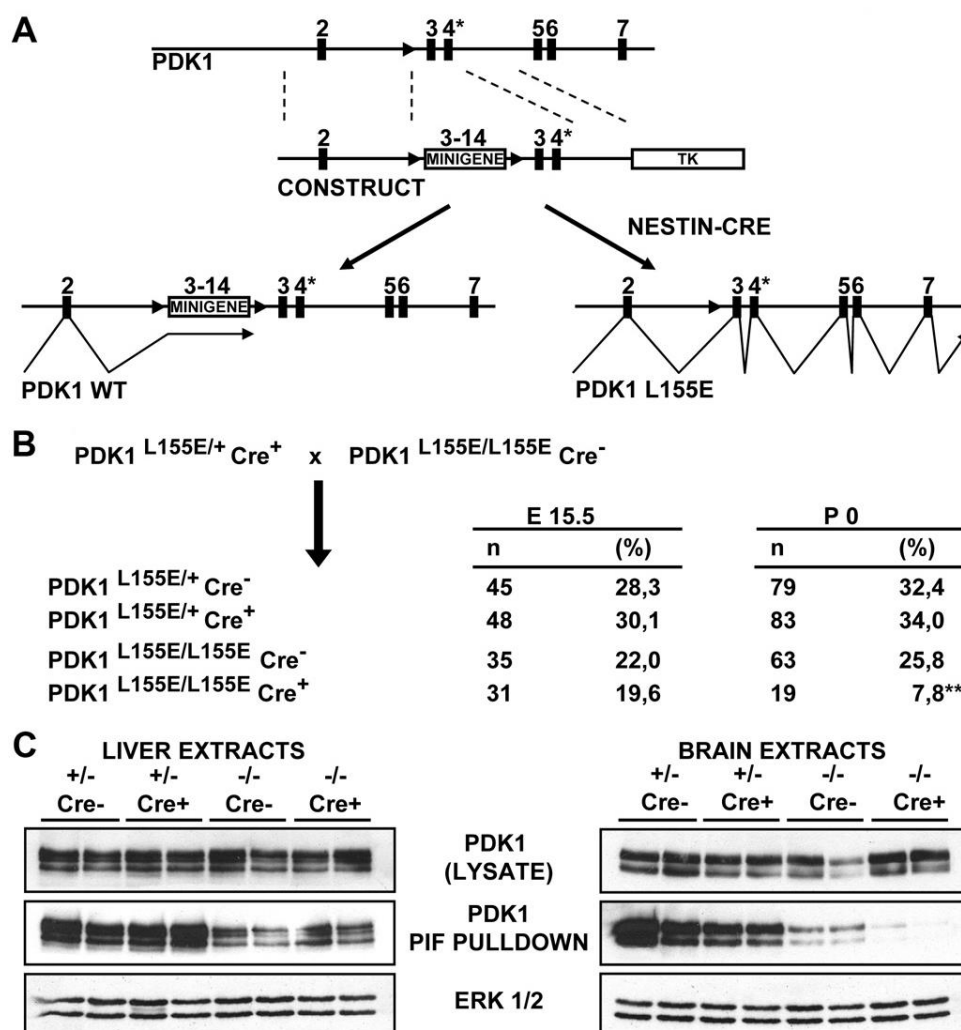


Figura 57. Generació dels ratolins amb la mutació de PDK1 L155E específica de teixit. (A) Diagrama on es mostra el gen de PDK1 des de l'exó 2 al 7 i l'al·lel condicional de PDK1, que conté la regió amb la pauta oberta de lectura corresponent als exons 3 al 14 (*minigene*) responsable de l'expressió de la proteïna salvatge de PDK1 en els teixits control (PDK1 WT); seguida d'una versió mutada de la regió corresponent als exons 3 i 4 de PDK1, que causa l'expressió de la proteïna mutant L155E de PDK1 a teixits que expressen la Cre-Recombinasa (PDK1 L155E). (B) Estratègia de creuaments per generar els ratolins que expressen la proteïna PDK1 L155E mutant al cervell. El nombre (n) i la proporció (%) de ratolins de cada genotip resultants del creuament experimental es troben indicats tant a dia embrionari 15.5 (E15.5) com en el naixement (P0). ** indica que la reducció en la freqüència esperada de les cries $PDK1^{-/-} Cre^{-}$ és significativa ($P < 0.005$ per χ^2 test). (C) La proteïna PDK1 va se purificada per afinitat amb la resina PIF-sefarosa a partir d'extractes proteics embrionaris de fetge (esquerra) i de cervell (dreta) dels corresponents genotips. Els panells superiors representen lisats totals

procedents dels diferents genotips i detectats amb l'anticòs contra PDK1. Els panells centrals representen la detecció de la proteïna PDK1 purificada amb la resina PIF-sefarosa a partir de lisats procedents dels genotips indicats. Els panells inferiors corresponen a la detecció de la proteïna ERK 1/2 com a control de càrrega.

1.1 La mutació L155E inhabilita el domini PIF-pocket de PDK1

Vàrem confirmar que l'al·lel condicional s'expressava adequadament i que la mutació PDK1 L155E no comprometia el correcte processament i plegament de la proteïna, tal i com ho demostren els nivells similars de proteïna PDK1 detectats en els diferents genotips analitzats (Fig.57C). D'altra banda, la substitució de la leucina 155 per un àcid glutàmic havia de comportar la inhabilitació del domini PIF-pocket de PDK1 i per comprovar-ho varen utilitzar el mètode del pull-down. Aquest mètode consisteix en incubar extractes proteics tant de teixits neuronals com teixits control amb un pèptid biotinilat que emula el motiu hidrofòbic fosforilat dels substrats de PDK1 i que es pot purificar en una resina d'estreptavidina sefarosa. La proteïna salvatge de PDK1 interacciona fortament amb el pèptid biotinilat i es pot detectar per western blot, mentre la proteïna mutada és incapaç d'interaccionar amb el pèptid, s'elueix en els rentats i conseqüentment no es pot resoldre per western blot. A partir dels extractes proteics de cervell embrionaris es va poder purificar PDK1 amb la mateixa eficiència en mostres d'embrions PDK1^{+/-}Cre⁻ i PDK1^{+/-}Cre⁺, en menor grau en mostres d'embrions PDK1^{-/-}Cre⁻, però va ser impossible de purificar PDK1 dels extractes de cervell procedents de ratolins PDK1^{-/-}Cre⁺ (Fig.57C). Així, el *leaking* del *minigene* que resulta en l'expressió de la proteïna mutant de PDK1 en absència de la Cre-Recombinasa, ens genera unes sèries al·lèliques de quantitats creixents de proteïna mutant de PDK1 en els diferents genotips estudiats. Aquest nou escenari representa un model genètic quantitatiu per estudiar l'impacte de la via dependent del PIF-pocket de PDK1. Com a control vàrem poder purificar nivells comparables de proteïna PDK1 en teixits on no s'expressa la Cre-Recombinasa procedents d'embrions PDK1^{-/-}Cre⁻ i PDK1^{-/-}Cre⁺ (Fig.57C). Sorprenentment, no vàrem poder purificar ni detectar la proteïna PDK1 de fins a 6 àrees cerebrals diferents en ratolins adults control PDK1^{-/-}Cre⁻ ni, com calia esperar, de ratolins mutants PDK1^{-/-}Cre⁺ (Fig.58A). D'altra banda, PDK1 sí que es podia purificar a nivells similars de teixits control, com ara el

cor o la melsa, d'organismes $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ i $PDK1^{-/-}Cre^{+}$, malgrat fos a nivells inferiors als obtinguts de ratolins $PDK1^{+/-}Cre^{-}$ (Fig.58B).

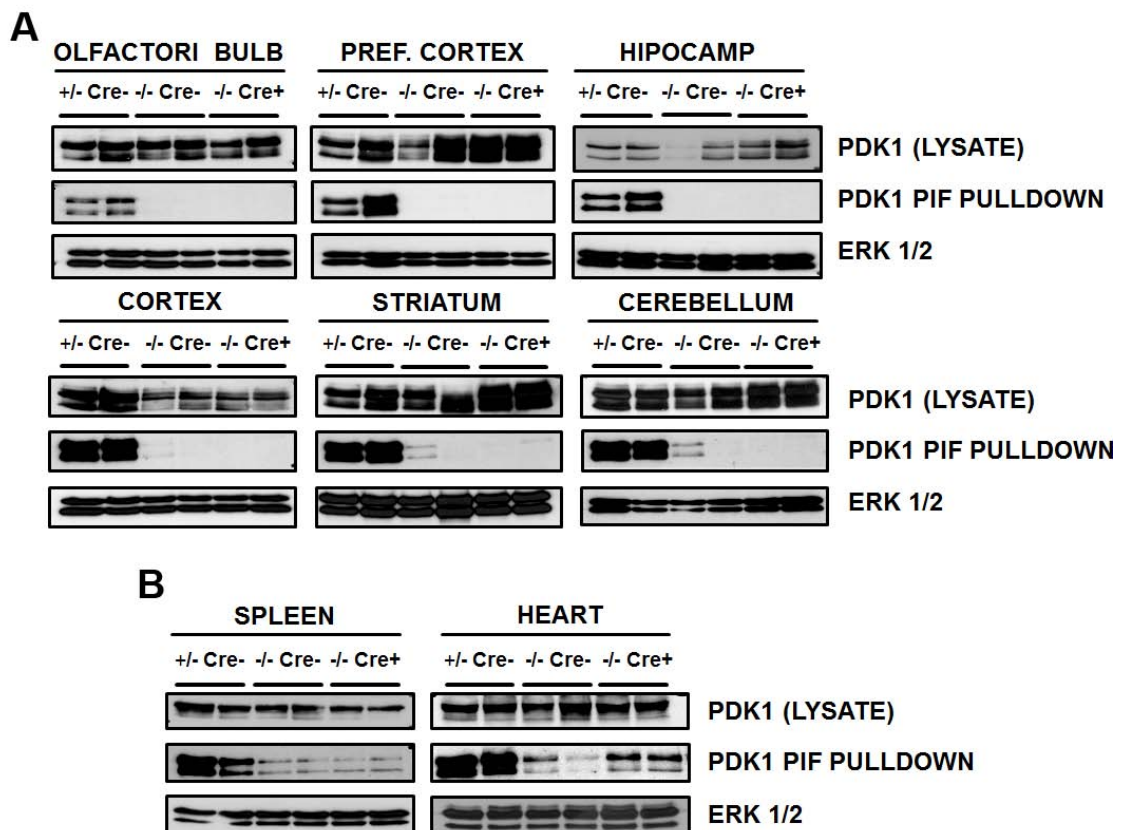


Figura 58. Caracterització de l'expressió de la proteïna mutant de PDK1 en teixits adults. (A) Purificació de la proteïna PDK1 per afinitat a la resina PIF-sefarosa a partir d'extractes proteics de 6 regions cerebrals diferents procedents de ratolins adults d'un any d'edat. Els panells superiors representen lisats totals dels genotips que s'indiquen detectats amb l'anticòs contra PDK1, els panells centrals representen la proteïna PDK1 purificada amb la resina PIF-sefarosa a partir de lisats procedents dels genotips indicats i detectada per Western blot, i els panells inferiors corresponen a la detecció de la proteïna ERK 1/2 com a control de càrrega. (B) Purificació de la proteïna PDK1 per afinitat a la resina PIF-sefarosa a partir d'extractes proteics de melsa i cor dels mateixos ratolins descrits a l'apartat (A).

La penetrància de la mutació en els ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ comparable a la dels ratolins mutants $PDK1^{-/-}Cre^{+}$ ens va portar a la hipòtesi que aquest fet pogués ser degut o bé a una inestabilitat genòmica que tingués lloc a les neurones post mitòtiques que provoqués l'escissió del *cassette* del *minigene*; o bé a una preferència per part de la maquinària neuronal de processament de l'RNA per excloure la regió corresponent al *minigene* del missatger madur, provocant així

que un homozigot que no expressi la Cre-Recombinassa es comporti com un mutant.

1.2 L'expressió de la proteïna mutant de PDK1 en ratolins PDK1^{-/-}Cre⁺ no es deu a una inestabilitat genòmica del transgen

Per respondre a la primera hipòtesis associada a la inestabilitat genòmica de les neurones postmitòtiques, vàrem optar per amplificar per PCR la regió compresa entre els exons 3 i 4 de l'al·lel de PDK1, que genera dos productes de diferent mida segons s'amplifiqui del locus endogen o del *minigene* i que es resolen diferencialment en un gel d'agarosa (Fig.59A).

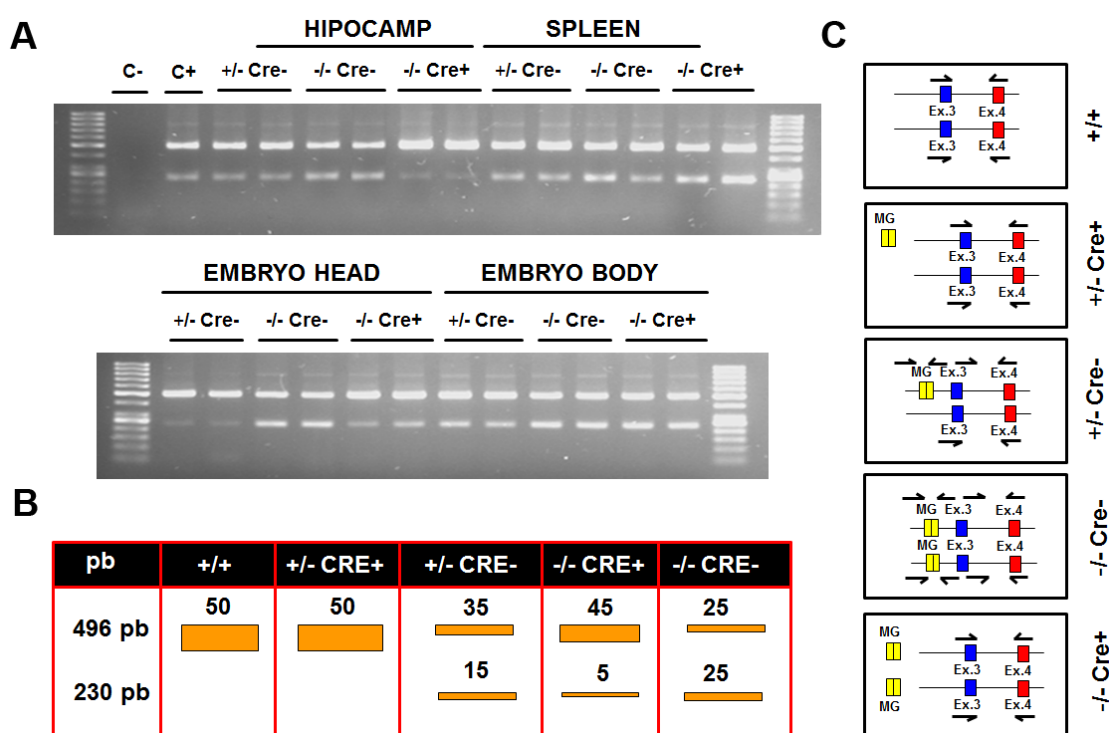


Figura 59. Anàlisi d'inestabilitat genòmica al locus de PDK1. (A) Amplificació de la regió corresponent als exons 3 i 4 del gen de PDK1, que genera un fragment de 496 pb corresponent a l'al·lel de PDK1 endògen i un menor de 230 pb corresponent al *minigene* de PDK1 que no presenta introns. L'amplificació es va realitzar a partir de mostres de DNA extretes de teixits procedents de ratolins adults (panell superior) com d'embrions a E15 (panell inferior) i es va resoldre en gels d'agarosa, on cada carril correspon a un embrió o ratolí independents. (B) Taula representativa de la proporció esperada d'ADN amplificat dels diferents genotips sobre un total de 50 ng teòrics d'ADN. (C) Esquema representatiu de la regió amplificable corresponent als exons 3 i 4 dels dos al·lells del gen de PDK1 que s'espera detectar als diferents genotips.

La proporció de cadascun dels fragments és dependent del tipus de genotip, ja que el fragment de 496 pb correspon a l'amplificació dels exons 3 i 4 que inclou la regió intrònica, i el fragment de 230 pb correspon a l'amplificació dels mateixos exons però absents de regió intrònica i que es troben inclosos en el cassette del *minigene* (Fig.59C). Tenint en compte els dos al·lells de PDK1, podem resoldre la proporció esperada de cada fragment de DNA amplificat en funció del genotip de cada ratolí. Per exemple, dels ratolins PDK1^{+/-}Cre⁻ esperem obtenir una proporció estimada major de la banda de 496 pb, resultant de l'amplificació dels 2 al·lells, respecte a la banda de 230 pb resultant de l'amplificació de l'únic al·lel que presenta el cassette del *minigene*. Si fem una relació teòrica a partir de 50 ng de DNA amplificat obtindríem, pel genotip PDK1^{+/-}Cre, 35 ng de DNA corresponent a l'amplificació de la regió de 496 pb i 15 ng de l'amplificació corresponent a la regió de 230 pb (Fig.59B).

Després de comparar les proporcions de DNA amplificat esperades de cada genotip amb els resultats de l'amplificació, podem concloure que no hi ha cap indicatiu que s'estigui donant una escissió del *minigene* a nivell genòmic per cap altra causa que no sigui la presència de la Cre-Recombinasa. Per tant, podem descartar la hipòtesis genòmica i queda a l'aire la hipòtesis del processament de l'RNA.

1.3 Penetrància bioquímica de la mutació PDK1 L155E en la via de la PI3K en ratolins adults

Per determinar l'impacte bioquímic de la mutació PDK1 L155E en la via de la PI3K vàrem analitzar, mitjançant western blot i amb fosfoanticossos específics, l'estat d'activació de diferents quinases representatives de la via de PDK1 dependent del PIF-pocket; i com a control la fosforilació de PKB i els seu substrat PRAS40, que són dependents del PH-domain de PDK1 (Fig. 60).

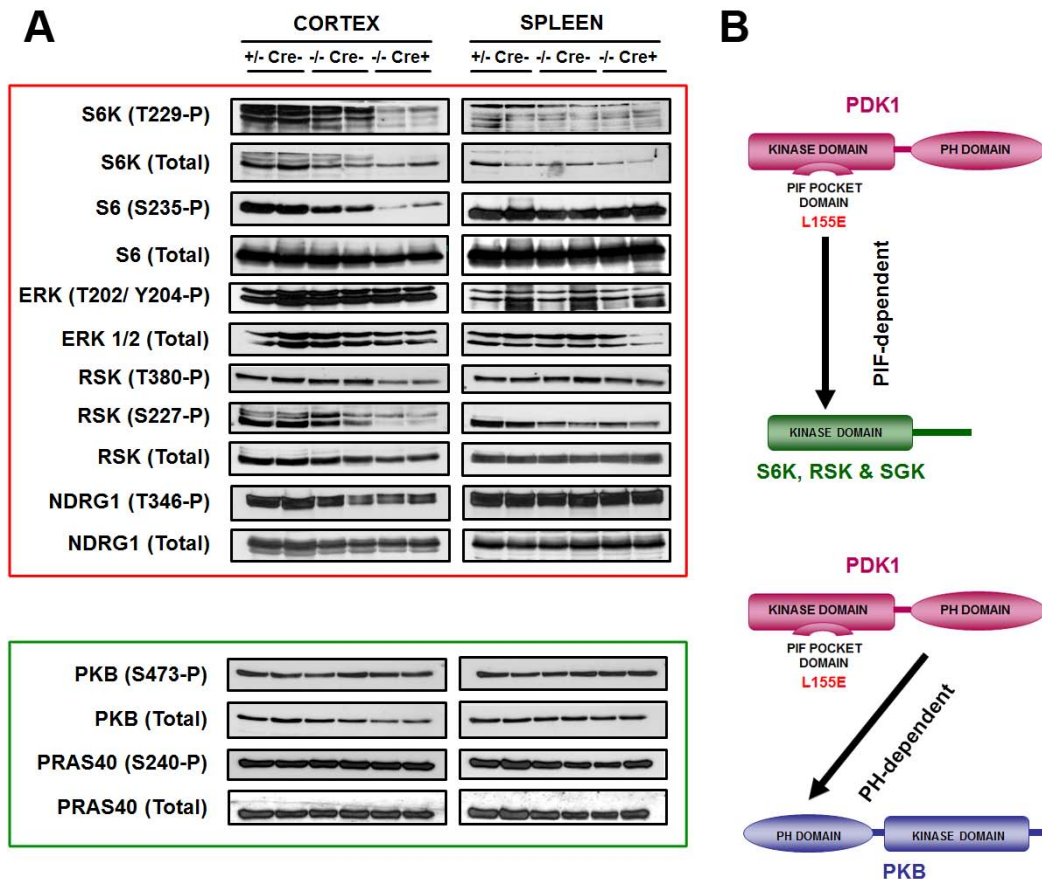


Figura 60. Anàlisi de la via de la PI3K en ratolins adults $PDK1^{-/-}Cre^{+}$. (A) Resolució per Western blot d'extractes proteics procedents del còrtex (cortex) i la melsa (spleen) de ratolins adults dels diferents genotips analitzats, on cada carril correspon a un ratolí independent. Al panell superior es mostra la detecció de les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1, com S6K i el seu substrat S6, RSK o SGK monitoritzada a través del seu substrat NDRG1; al panell inferior es mostra també la via dependent del PH-domain de PDK1 mitjançant la detecció de PKB i el seu substrat PRAS40. (B) Esquema representatiu de la dependència de les diferents quinases als respectius dominis PIF-pocket i PH-domain de PDK1.

En lisats proteics procedents del còrtex de ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{+}$, que és una regió del sistema nerviós central i que per tant expressa la Cre-Recombinasa, vàrem poder apreciar l'absència de fosforilació basal de S6K en la Treonina 229, aminoàcid del *T-loop* de la quinasa i que és fosforilable per PDK1, del seu substrat S6 en la serina 235, i de RSK a la serina 227 que correspon al lloc dins del *T-loop* fosforilat per PDK1. D'altra banda, la mutació no afectava la fosforilació de RSK en la Serina 380, ja que aquest lloc és dependent de ERK, que de la mateixa manera, es troba normalment fosforilada en el ratolí mutant. Sorprenentment NDRG1, substrat de la quinasa SGK i que per tant estaria sota el control del PIF-pocket de PDK1, presenta una reducció però no una

desaparició de la seva fosforilació tant en els extractes corticals procedents dels ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ com en els $PDK1^{-/-}Cre^{+}$. Per contra, en teixits no neuronals com la melsa, els substrats dependents del PIF-pocket de PDK1 són fosforilats i activats de forma comparable entre els diferents genotips; la qual cosa indica de nou l'especificitat d'expressió tissular de la Cre-Recombinasa (Fig.60A).

En canvi, PKB és activada amb normalitat, tal i com observem per la seva fosforilació i la del seu substrat PRAS40 en la serina 240; que resulta comparable entre els diferents genotips, tant en els extractes proteics procedents del còrtex com en els procedents d'un teixit no neuronal com la melsa.

1.4 Microcefàlia i reducció del volum neuronal en els ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ i $PDK1^{-/-}Cre^{+}$

Els ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ i $PDK1^{-/-}Cre^{+}$ presenten microcefàlia, amb una reducció del 20% en la mida del cervell respecte als ratolins control germans de camada $PDK1^{+/-}Cre^{-}$ i $PDK1^{+/-}Cre^{+}$ (Fig.61B). Aquesta reducció és probablement deguda a una reducció de les diferents regions cerebrals associada a una reducció del nombre de cèl·lules i del seu volum, tal i com es descriu en el cas de les neurones corticals purificades d'embrions a E15.5 (Fig.61A).

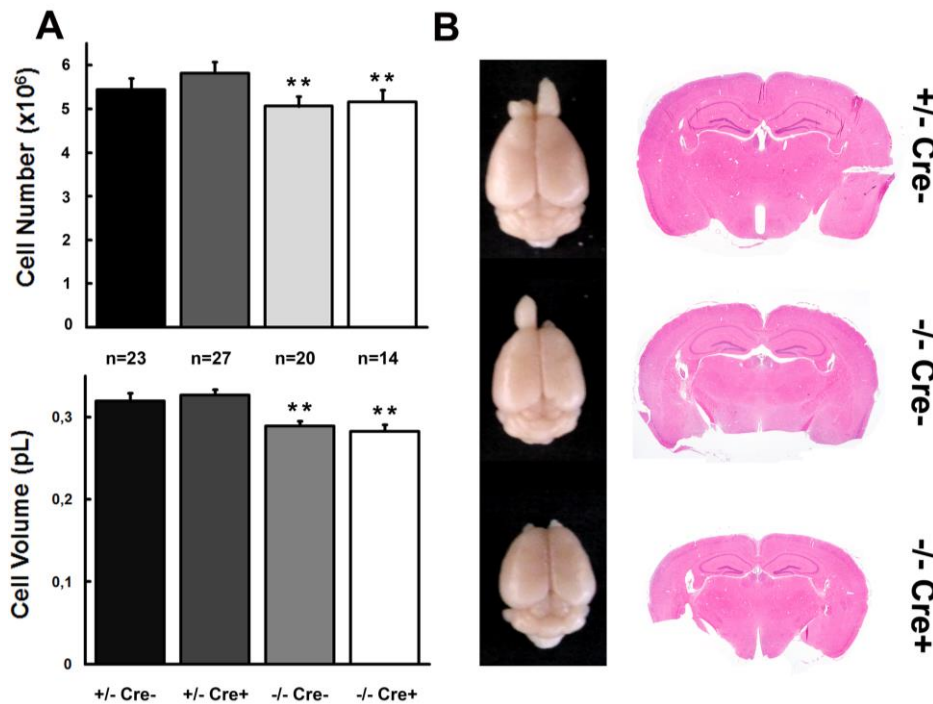


Figura 61. Microcefàlia dels ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ i $PDK1^{-/-}Cre^{+}$. (A) Gràfiques on es determina el volum i el nombre de cèl·lules corticals obtingudes d'embrions E15.5 dels diferents genotips que s'indiquen. Les dades es representen com a mitjanes \pm l'error estàndard de les mitjanes pel nombre indicat d'embrions (n) obtinguts a partir de 12 creuaments independents. (B) Imatges representatives pels diferents genotips indicats de cervells procedents de ratolins adults (marge esquerra) i les seves seccions caudals fotografiades a 2x i tenyides amb els colorants hematoxilina-eosina (marge dret).

2. La mutació en el PIF-pocket de PDK1 impedeix l'activació de S6K, RSK i SGK, però no de PKB

A fi de definir la importància del domini PIF-pocket de PDK1 a l'hora d'activar els seus substrats, vàrem establir cultius primaris de neurones corticals generats a partir d'embrions d'edat E15.5. Les neurones procedents dels ratolins germans de camada $PDK1^{+/-}Cre^{-}$, $PDK1^{+/-}Cre^{+}$, $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ i $PDK1^{-/-}Cre^{+}$ varen ser cultivades sis dies in vitro (DIV6), deprivades de sèrum i nutrients durant 4 hores i estimulades amb 50 ng/ml de BDNF durant els diferents temps establerts.

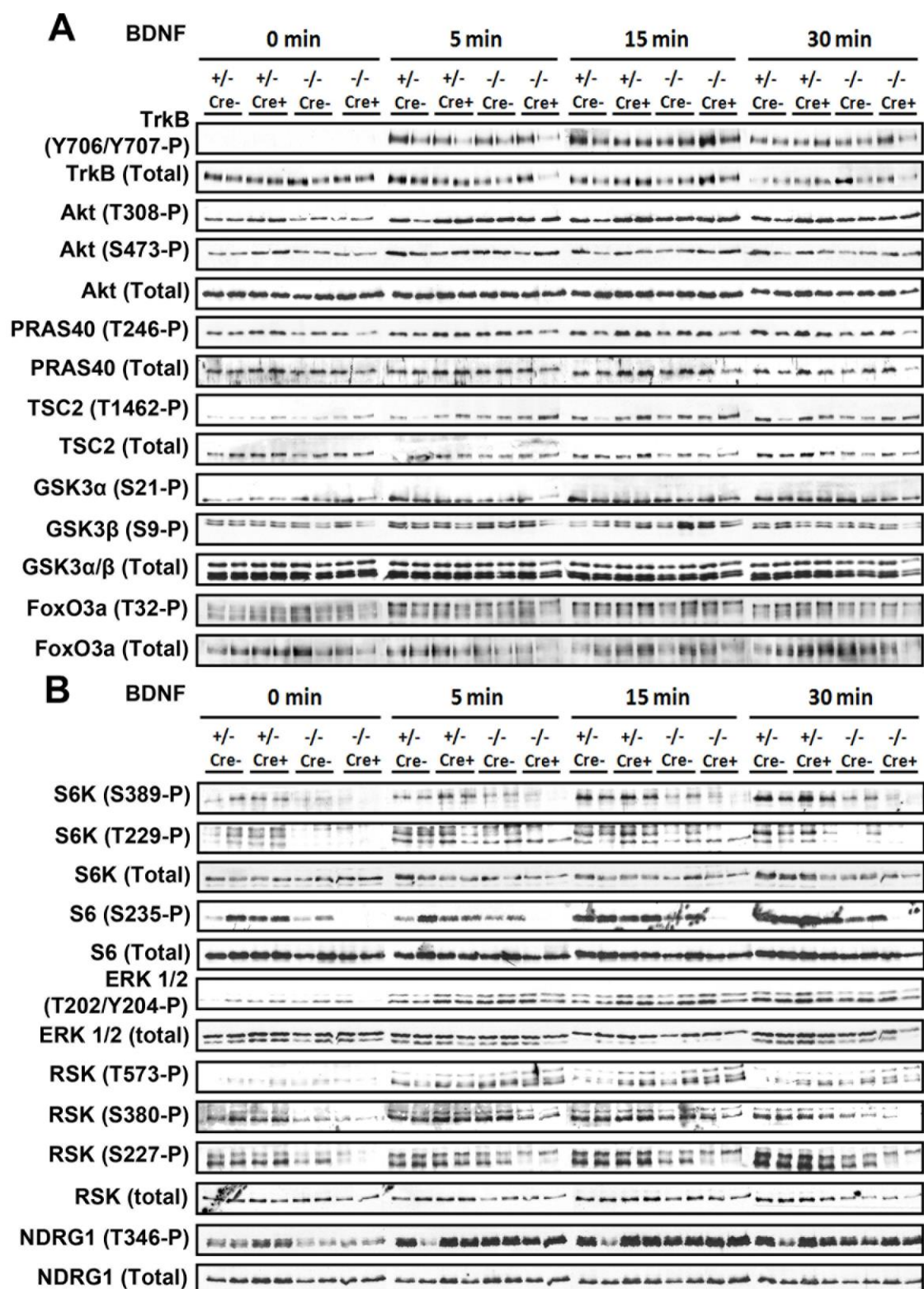


Figura 62. L'activació de l'S6K, d'SGK i de RSK, però no de PKB, és inhibida en els ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{+}$. (A-B) Cultius primaris de neurones corticals dels genotips indicats es varen cultivar durant 6 DIV, deprivar durant 4 hores de sèrum i nutrients i estimular o no (control) amb 50 ng/ml de BDNF durant els temps indicats. Els lisats es varen resoldre per

Western Blot amb fosfoanticossos específics a fi de monitoritzar l'activació de PKB i de les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1, com la S6K, RSK i SGK.

Com a control de l'estimulació i de l'iniciació de la via de la PI3K, vàrem comprovar que el BDNF indueix una ràpida activació de TrkB, monitoritzada per la fosforilació sostinguda en el temps de les Tirosines 706 i 707 presents en el lloc d'activació del domini quinasa del receptor, d'una forma equiparable en els diferents genotips analitzats.

PKB presenta una clara resposta d'activació a través de la fosforilació dels seus dos residus d'activació, la Treonina 308 corresponent al T-loop de la quinasa per part de PDK1 i la Serina 473 present en el motiu hidrofòbic a través d'mTORC2. L'activació de PKB i la fosforilació dels seus substrats en la Treonina 246 en el cas de PRAS40, en la Treonina 1462 de TSC2, en les Serines 9 i 21 de les corresponents isoformes α i β de GSK3, i en la Treonina 32 de FoXO3a, es satura als 5 minuts de l'estimulació amb BDNF i es sosté fins a les exposicions més llargues a la neurotrofina a nivells comparables en els diferents genotips analitzats (Fig.62A).

La fosforilació de S6K en la Treonina 229 del T-loop per PDK1 i la Serina 389 corresponent al seu motiu hidrofòbic per mTORC1, es veuen dràsticament reduïdes en les neurones corticals procedents dels ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ respecte els $PDK1^{+/-}Cre^{-}$ o $PDK1^{+/-}Cre^{+}$; mentre que desapareixen completament en les neurones $PDK1^{-/-}Cre^{+}$. El dèficit d'activació de la S6K dependent del genotip es veu reflexat de forma proporcional en la fosforilació del seu substrat S6 en la Serina 235, la qual assoleix el seu màxim als 15 minuts i es sosté fins a períodes de 30 minuts en presència de BDNF en els ratolins $PDK1^{+/-}Cre^{-}$ o $PDK1^{+/-}Cre^{+}$, es redueix en les neurones $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ i desapareix totalment en les neurones $PDK1^{-/-}Cre^{+}$ (Fig.62B).

L'estimulació amb BDNF indueix una ràpida activació de la via de la MAPK, que conclou amb la fosforilació d'ERK 1/2 en la treonina 202 i la tirosina 204 del seu lloc d'activació. La fosforilació d'aquests aminoàcids resulta invariable pels diferents genotips assajats i es trasllada de forma equiparable a la fosforilació de la Treonina 573 en l'extrem C-terminal del seu substrat RSK. El plegament del domini catalític C-terminal permet l'autofosforilació del motiu hidrofòbic de la

quinasa en la Serina 380, fet que genera un docking site que és reconegut pel PIF-pocket de PDK1 i permet així la conseqüent fosforilació de la serina 227 en el *T-loop* del domini catalític N-terminal de RSK en les neurones corticals procedents dels ratolins control PDK1^{+/-}Cre⁻ o PDK1^{+/-}Cre⁺. D'altra banda, es dona una reducció en la fosforilació del T-loop de RSK a les neurones PDK1^{-/-}Cre⁻, fosforilació que desapareix completament en els extractes proteics procedents de neurones PDK1^{-/-}Cre⁺. D'aquesta forma, l'activació per fosforilació de les quinases RSK i la S6K decreix en funció del genotip, generant sèries al·lèliques d'inactivació d'aquestes quinases associades a increments d'expressió de la proteïna mutant de PDK1 (Fig.62B).

A fi de monitoritzar la fosforilació de la SGK, la qual es troba inclosa en el grup de quinases dependents del PIF-pocket de PDK1, s'ha utilitzat com a referència el seu substrat NDRG1. En absència de BDNF, la fosforilació del substrat NDRG1 en la Treonina 346 per SGK1 es veu dràsticament reduïda tant en les neurones corticals PDK1^{-/-}Cre⁻ com en les PDK1^{-/-}Cre⁺ quan es compara amb els seus controls; mentre que l'estimulació d'aquestes amb BDNF indueix un augment de la fosforilació d'NDRG1 equiparable en tots els quatre genotips analitzats (Fig.62B).

3. L'activació exclusiva de les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1 no és indispensable per les respostes de supervivència neuronal

La via de la PI3K/PDK1/PKB es troba implicada en respostes de supervivència alhora que impedeix l'activació de processos d'apoptosi o d'autofàgia. Partint d'aquesta premissa, vàrem voler determinar quin impacte tindria la desregulació de l'activitat de les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1 en les respostes neuronals que han estat històricament atribuïdes a PKB.

3.1 L'efecte neuroprotector del BDNF no es veu significativament alterat en les neurones corticals PDK1^{-/-}Cre⁺

S'avaluà la viabilitat cel·lular de neurones purificades d'embrions a E15.5 i cultivades en medi complet o deprivades de sèrum i nutrients en presència o

absència de BDNF, utilitzant les tècniques d'assaig per MTT contrastada amb l'anàlisi del Hoechst.

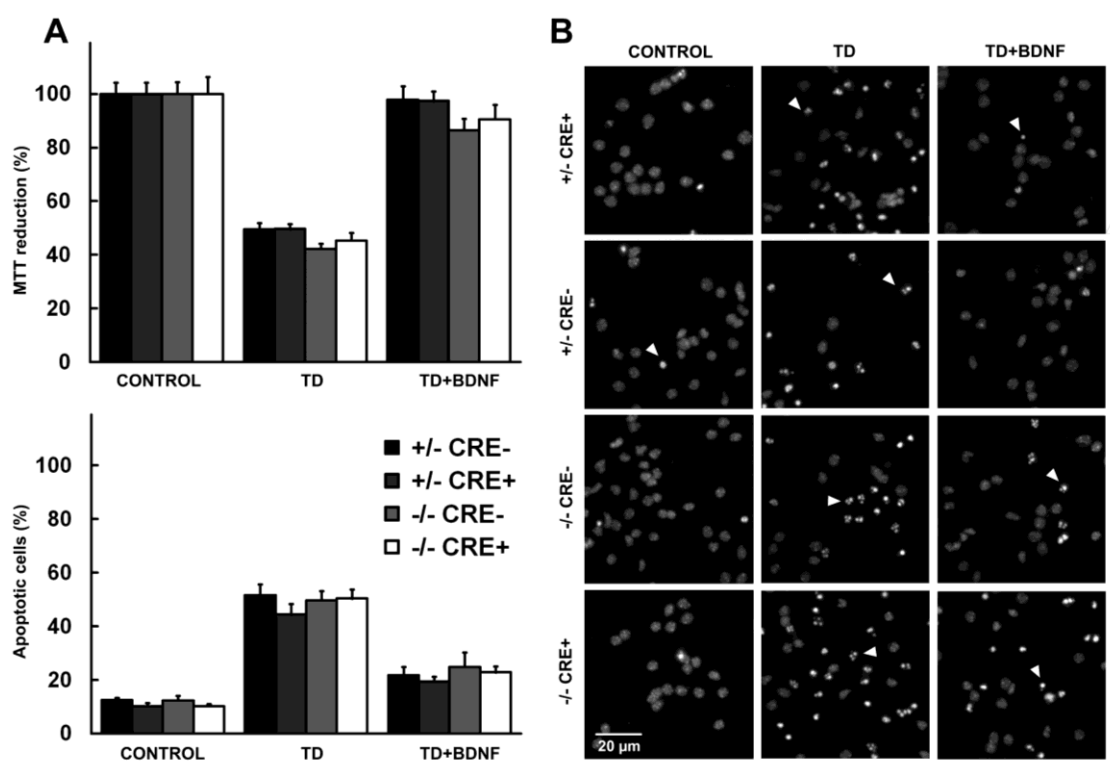


Figura 63. La viabilitat neuronal no resulta afectada per la mutació del PIF-pocket de PDK1. (A) Neurons embrionàries corticals cultivades durant 5 DIV deprivades o no (CONTROL) en absència (TD) o presència (TD+BDNF) de 50 ng/ml de BDNF durant 24 hores. La viabilitat cel·lular va ser determinada per l'assaig d'MTT i expressada en valors de proporció (%) de cèl·lules viables respecte el control. El percentatge de cèl·lules apoptòtiques es va obtenir a partir del recompte de les neurones que exhibien fragmentació o condensació nuclear respecte el total de neurones presents en aquell camp. El nombre total de neurones resulta del comptatge de 6 camps per pou de 4 pous per cada condició. La dada es representa com a la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana de 3 embrions independents per genotip procedents de 6 creuaments diferents. (B) Imatges representatives de les neurones corticals corresponents als experiments descrits en (A) i que han estat tenyides amb el colorant nuclear Hoechst. Les fletxes indiquen les neurones apoptòtiques identificables per la seva morfologia nuclear fragmentada i/o condensada.

La deprivació tròfica de les neurones corticals comporta una reducció del 50% en la seva viabilitat, reflexada en una disminució dels valors d'MTT i en un increment del nombre de cèl·lules apoptòtiques. D'altra banda, la presència de BDNF provoca una reducció de fins un 60% en l'apoptosi neuronal induïda per la deprivació tròfica i un rescat al voltant del 50% de la viabilitat cel·lular en les

neurones control PDK1^{+/-}Cre⁻ i PDK1^{+/-}Cre⁺. Sorprenentment, la inhabilitació del PIF-pocket de PDK1 en neurones d'embrions PDK1^{-/-}Cre⁻ i PDK1^{-/-}Cre⁺ no comprometia significativament els efectes neuroprotectors del BDNF en les situacions d'estrès per manca de sèrum i nutrients respecte les neurones corticals que no presentaven la mutació (Fig.63).

Les neurones corticals procedents dels ratolins que presentaven la mutació en el PH-domain de PDK1, que resulta en una reducció en l'activitat de PKB, tampoc no presentaven alteracions en les respostes de viabilitat cel·lular (Zurashvili et al., 2013). Tenint en compte que PDK1 és requerida per la supervivència de neurones corticals intercedida pel BDNF (Kharebava et al., 2008), però que ni la inhabilitació de les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1 ni la de les dependents del PH-domain contribuïa a una alteració significativa de la supervivència neuronal vàrem voler esbrinar quina o quines quinases efectores de PDK1 estaven implicades en aquesta resposta cel·lular.

3.2 La viabilitat neuronal depèn de la via de la PI3K a través de PDK1 i d'mTORC2

A fi de resoldre la qüestió plantejada vàrem disseccionar la via de la PI3K des de la part més apical a la més basal amb diferents inhibidors (veure mètodes) de l'extens entramat de quinases que la conformen, per comprovar fins a quin punt la seva inhibició comprometia els efectes neuroprotectors del BDNF.

Les diferents dosis dels inhibidors les vàrem establir a partir de la literatura i contrastant bioquímicament que fossin específiques pel substrat diana, ja que la majoria d'ells exerceixen una inhibició competitiva pel lloc d'unió de l'ATP, i també perquè només s'havien caracteritzat en línies cel·lulars. Un clar exemple són els inhibidors de PDK1 i de la SGK, que a dosis de 10 µM eliminen totalment l'efecte neuroprotector del BDNF probablement com a conseqüència d'una inhibició inespecífica de diferents quinases i comprometen totalment la viabilitat de les neurones corticals, la qual cosa es reflexa en una reducció dels valors d'MTT per sota dels obtinguts amb les neurones només deprivades de sèrum i nutrients. També vàrem definir pels assajos bioquímics el temps de 15 minuts d'exposició a la neurotrofina en presència dels inhibidors, ja que era el

punt de màxima fosforilació de la majoria de les quinases de la via de la PI3K i a partir d'on es saturava la senyal (Fig.64).

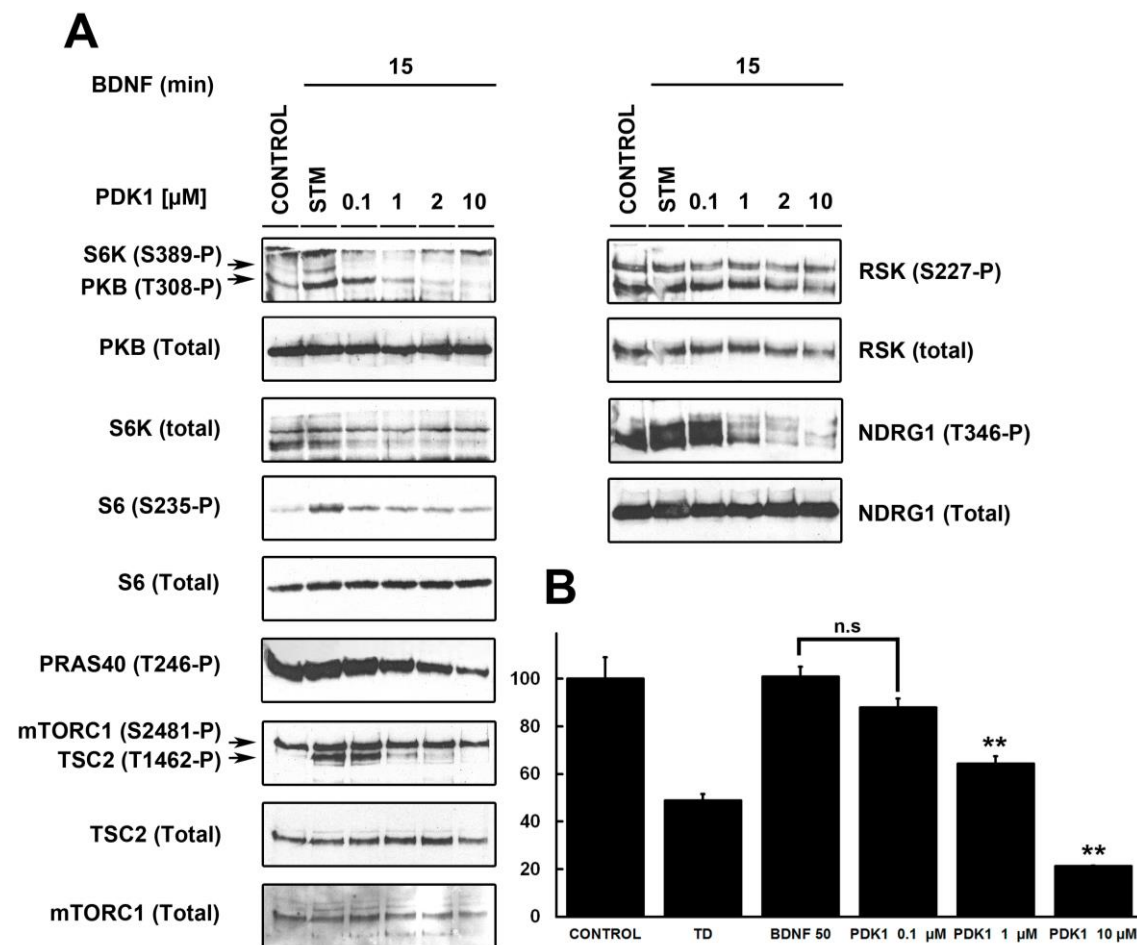


Figura 64. Conseqüències de la inhibició farmacològica de PDK1 en neurones corticals.

(A) Cultius primaris de neurones corticals procedents de ratolins salvatges varen ser deprivats o no (CONTROL) de sèrum i nutrients a DIV6 durant 4 hores, tractats amb dosis creixents de l'inhibidor de PDK1 (0, 0.1, 1, 2, 10 μM) durant 30 minuts, i estimulats amb 50 ng/ml de BDNF durant 15 minuts. Els extractes proteics obtinguts varen ser resoltos per Western Blot i es va monitoritzar l'estat d'activació de les diferents quinases detectant els seus residus d'activació amb els corresponents fosfoanticossos específics. (B) Cultius de neurones corticals cultivades durant 5 DIV que posteriorment són deprivades o no (CONTROL) en absència (TD) o presència (BDNF 50) de 50 ng/ml de BDNF i cotractades amb les dosis de l'inhibidor de PDK1 indicades durant 24 hores. La viabilitat cel·lular va ser determinada per l'assaig d'MTT i expressada en valors de proporció (%) de cèl·lules viables respecte el CONTROL.

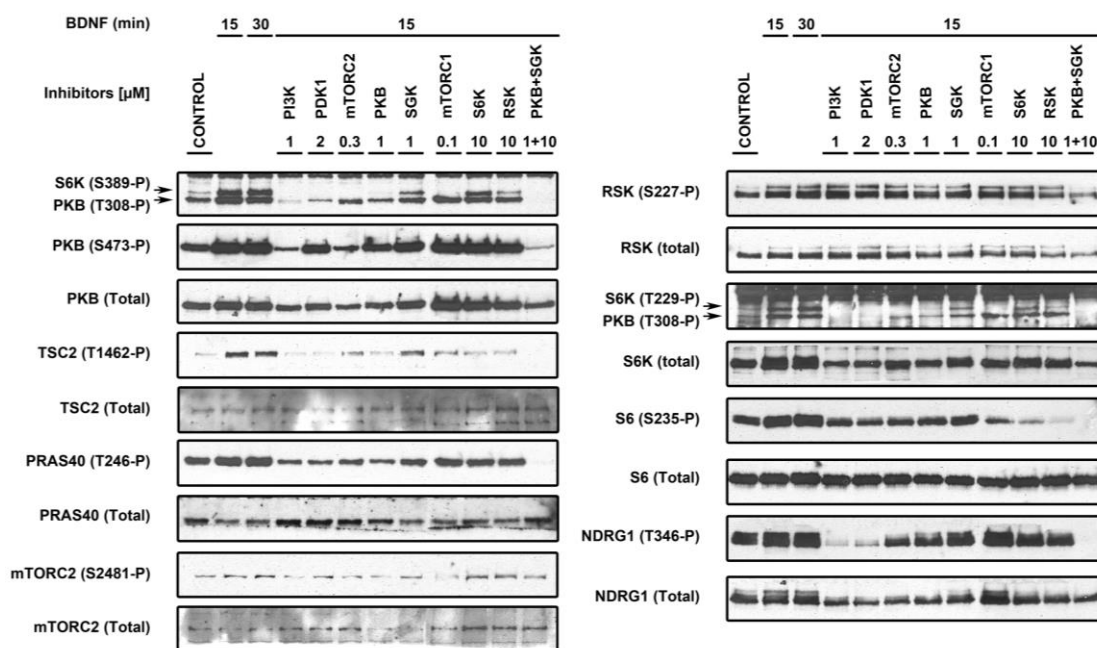


Figura 65. Dissecció bioquímica de la via de la PI3K a través de la inhibició de les quinases que la conformen. Cultius primaris de neurones corticals procedents de ratolins salvatges que varen ser deprivats o no (CONTROL) de sèrum i nutrients a DIV6 durant 4 hores, tractats o no amb les corresponents dosis dels diferents inhibidors durant 30 minuts, i estimulats amb 50 ng/ml de BDNF durant els temps indicats. Els extractes proteics varen ser resolts per Western Blot i es va monitoritzar l'activació de les diferents quinases detectant els seus residus d'activació amb els corresponents fosfoanticossos específics.

La inhibició a les dosis establertes per la PI3K i PDK1 comporta una reducció en la fosforilació de la Treonina 308 dins del *T-loop* de PKB, quinasa implicada clàssicament en supervivència. L'activitat romanent no es suficient per mantenir la fosforilació dels dos grans substrats de PKB repressors d'mTORC1, TSC2 en la Treonina 1462 i PRAS40 en la Treonina 246, resultant en nivells de fosforilació equiparables als obtinguts en presència de l'inhibidor de PKB. La inhibició de la PI3K, de PDK1 i de PKB acaba inhabilitant l'eix PKB/mTORC1 observable amb la caiguda de la fosforilació de la Serina 229 i la Treonina 389 de la S6K i conseqüentment la de la Serina 235 al seu substrat S6, de forma equivalent a la inhibició d'mTORC1. D'altra banda, trobem que la inhibició d'mTORC2 implica una reducció en la fosforilació de la Serina 473 present en el motiu hidrofòbic de PKB que resulta inalterada en presència de l'inhibidor de PDK1. Això permet una disminució de la fosforilació de PRAS40 i TSC2 menor

a la obtinguda amb l'inhibidor de la PI3K, amb el de PDK1 o amb el de PKB com a conseqüència de preservar la fosforilació del *T-loop* de PKB (Fig.65).

El lligam entre la via de les MAPK i la PI3K és RSK. La seva inhibició comporta una reducció de la fosforilació dels llocs d'activació de la S6K i per tant una pèrdua clara de fosforilació en el seu substrat S6, que és compartit amb la S6K. La inhibició d'ambdues quinases comporta una reducció en la fosforilació de TSC2, preservant l'activació de la resta de substrats analitzats que pertanyen a la via de la PI3K (Fig.65).

La inhibició de la SGK comporta únicament una lleu reducció de la fosforilació del seu substrat NDRG1, que es redueix proporcionalment i de forma correlacionada a la presència dels inhibidors de la PI3K, de PDK1, de PKB i d'mTORC2. Aquesta última quinasa s'encarrega de la fosforilació tant del motiu hidrofòbic de PKB com del de la SGK, on ambdues comparteixen el lloc de fosforilació per NDRG1 de forma diferencial a la presència del BDNF (Fig.65).

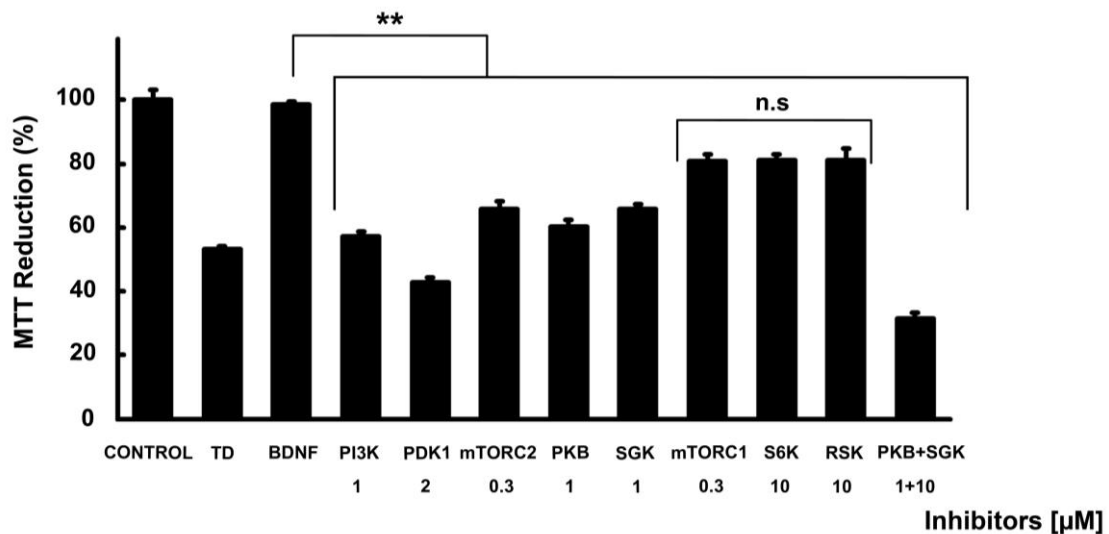


Figura 66. Implicació de les quinases de la via de la PI3K en la supervivència neuronal. Cultius de neurones corticals cultivades durant 5 DIV que posteriorment són deprivades o no (CONTROL) en absència (TD) o presència (BDNF) de 50 ng/ml de BDNF i cocontractades amb les corresponents dosis dels diferents inhibidors durant 24 hores. La viabilitat cel·lular va ser determinada per l'assaig d'MTT i expressada en valors de proporció (%) de cèl·lules viables respecte el CONTROL.

A fi de veure com es traslladaven les diferents afectacions bioquímiques a les respostes neuronals de supervivència, vàrem establir cultius primaris de neurones corticals a E15.5 en medi complert i deprivats a DIV5 de sèrum i nutrients en absència o presència de BDNF i dels corresponents inhibidors. D'entre tots ells vàrem poder observar que la inhibició de les quinases apicals de la via com PDK1, mTORC2, PKB i inclosa la PI3K evitava, d'una forma gairebé total respecte altres inhibidors, el rescat de la viabilitat neuronal intercedida per la neurotrofina BDNF. A més a més, la combinació de l'inhibidor de PKB amb el de la SGK a concentracions possiblement inespecífiques, no només elimina l'efecte neuroprotector del BDNF sinó que també disminueix la supervivència neuronal per sota dels valors assolits amb la deprivació tròfica (Fig.66).

3.3 Sinèrgia d'SGK i de PKB en les respostes de supervivència neuronal

Després dels anteriors experiments, hem pogut constatar com la inhibició farmacològica de l'eix PI3K/PDK1/PKB compromet la supervivència cel·lular induïda pel BDNF, i mostrar que aquest fet es reproduïx de forma comparable al inhibir mTORC2, responsable de la fosforilació del motiu hidrofòbic de PKB i SGK. D'altra banda, l'ablació genètica de la funció dels dominis PH i PIF-pocket de PDK1 que resultava en les corresponents inhibicions en l'activitat de PKB, o d' SGK, RSK i S6K respectivament; no afectaven a la viabilitat de les neurones corticals en cultiu. Tenint en compte tots els resultats anteriors, vàrem arribar a pensar en una possible sinèrgia de PKB i SGK en les respostes neuronals de supervivència com a possible explicació a la manca d'efecte resultant d'inhibir genèticament es dues branques de PDK1 independentment.

Per això vàrem tractar cultius primaris de neurones corticals deprivades tròficament i estimulades amb BDNF amb dosis creixents de l'inhibidor de la SGK, en presència o absència d'una concentració fixa de l'inhibidor de PKB.

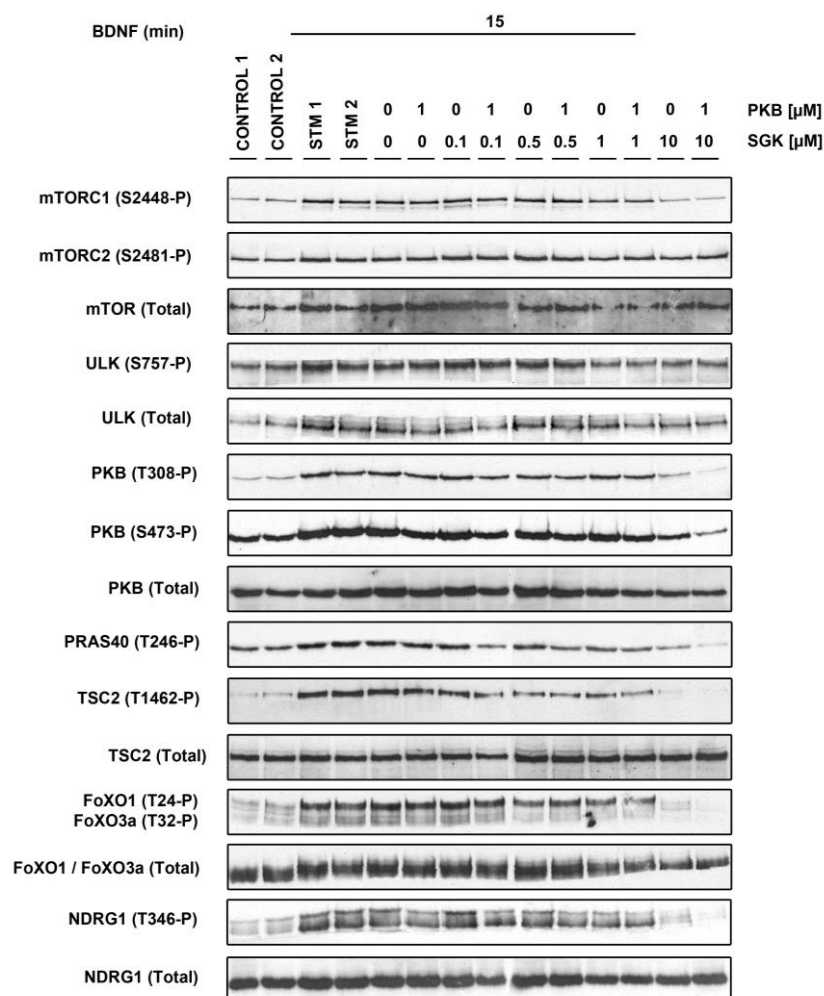


Figura 67. Dissecció bioquímica dels substrats regulats per SGK i PKB i que podrien orquestrar les respostes de supervivència neuronal. Cultius primaris de neurones corticals procedents de ratolins salvatges que varen ser deprivats o no (CONTROL1 i CONTROL2) de sèrum i nutrients a DIV6 durant 4 hores, tractats o no (STM1 i STM2) amb les corresponents dosis dels inhibidors de les quinases PKB i SGK durant els 30 minuts, i estimulats amb 50 ng/ml de BDNF durant 15 minuts. Els corresponents extractes proteics varen ser resoltos per Western Blot i es va monitoritzar l'activació de les diferents quinases detectant els seus residus d'activació amb els corresponents fosfoanticossos específics. Els extractes proteics dels carrils corresponents als CONTROL i STM resoltos per Western Blott procedeixen d'embrions independents.

La inhibició d'SGK a partir de concentracions de 0.5 μM fins a 1 μM disminueix la fosforilació d'ULK, FoxO i NDRG1 en absència de l'inhibidor de PKB. D'altra banda, la inhibició d'aquesta quinasa confereix una reducció major en la fosforilació dels llocs d'activació de PKB i conseqüentment dels seus substrats PRAS40, TSC2 i NDRG1 tant en absència de l'inhibidor d'SGK com en

presència de les diferents dosis de l'inhibidor. Les neurones corticals cultivades amb concentracions de 10 μM d'inhibidor de la SGK presenten una clara reducció en la fosforilació de la Treonina 308 i la Serina 473 de PKB, la Treonina 1462 de TSC2, la Treonina 246 de PRAS40, la Treonina 24 de FoXO1 i la Treonina 32 de FoXO3a, fosforilacions que es veuen completament eliminades al co-tractar les neurones corticals amb l'inhibidor de PKB. Aquest inhibidor, contràriament, no elimina la fosforilació de la serina 2448 ni la 2481 d'mTOR, així com tampoc la del seu substrat ULK fins i tot a dosis màximes de l'inhibidor d'SGK (Fig.67).

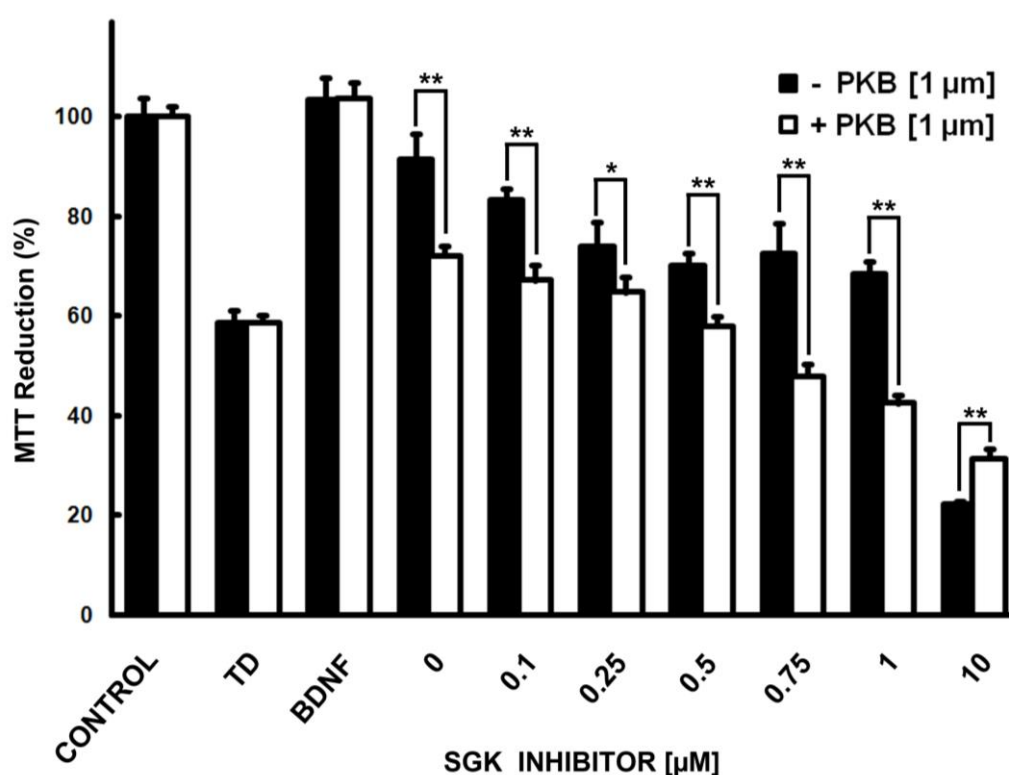


Figura 68. Sinèrgia de SGK i de PKB en les respostes de supervivència neuronal. Neurones corticals en cultiu durant 5 DIV deprivades o no (CONTROL), en absència (TD) o presència (BDNF) de 50 ng/ml de BDNF i tractades o no (STM1 i STM2) amb les corresponents dosis dels inhibidors de les quinases PKB i SGK durant 24 hores. La viabilitat cel·lular va ser determinada per l'assaig d'MTT i expressada en valors de proporció (%) de cèl·lules viables respecte el CONTROL.

La inhibició d'SGK i les corresponents conseqüències bioquímiques en els seus substrats comporta una reducció dosi dependent de la viabilitat cel·lular

promoguda pel BDNF, que es veu agreujada significativament al cotractar les neurones corticals amb l'inhibidor de PKB (Fig.68).

4. PDK1 promou el desenvolupament neuronal a través de les quinases dependents del PIF-pocket

La via de la PI3K controla diferents processos durant el desenvolupament neuronal i per això vàrem utilitzar el model del ratolí *knockin* condicional per la mutació L155E en el PIF-pocket de PDK1, on a partir de l'anàlisi de cultius primaris de neurones hipocampals a diferents dies del desenvolupament embrionari, es va caracteritzar la implicació de les quinases dependents d'aquest domini de PDK1 en la polarització neuronal, el creixement axonal i l'arborització dendrítica.

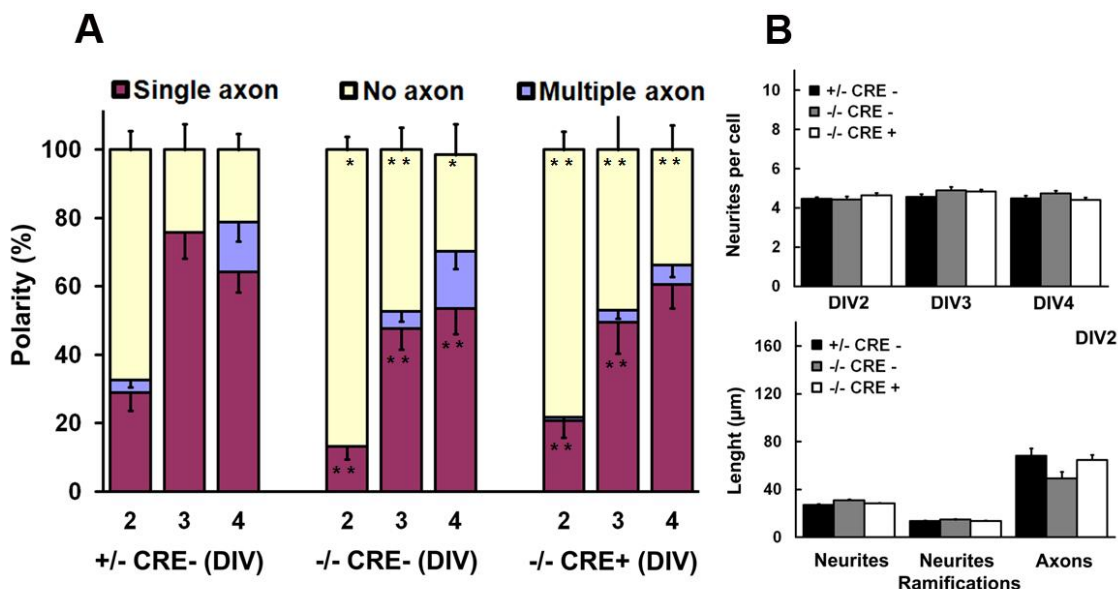


Figura 69. Dèficits de polarització i normalitat en el procés de neuritogènesi de les neurones procedents d'embrions $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ i $PDK1^{-/-}Cre^{+}$. (A) Els resultats provenen de l'anàlisi, al llarg dels diferents DIV, dels cultius de neurones hipocampals dels genotips indicats que han estat tenyits amb el marcador específic d'axó Tau-1 i el dendrític MAP2. El gràfic representa la polarització neuronal amb el % de neurones sense axó, que presenten un axó o múltiples axons respecte el nombre total de neurones comptabilitzades. (B) A partir de les mateixes mostres descrites en l'anterior apartat, es representen el nombre de neurites per cada neurona (gràfica superior) i la longitud tant de les neurites i les seves ramificacions com la dels axons (gràfica inferior) al llarg dels diferents DIV pels corresponents genotips. Cada barra representa la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana que inclou 100 neurones procedents de 3 embrions independents per a cada condició.

La diferenciació axonal, observada amb l'expressió de la proteïna associada a microtúbuls Tau, és dóna d'una forma exponencial entre els DIV2 i 3 en cultius de neurones hipocampals $PDK1^{+/-}Cre^{-}$. El mateix fenomen té lloc en les neurones purificades de ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ i $PDK1^{-/-}Cre^{+}$, malgrat presentin una reducció del voltant del 50% del nombre de cèl.lules que inicien el procés de polarització neuronal. D'altra banda, els nombre de neurites i el seu creixement, així com també el de les dendrites i les seves ramificacions, ocorren de forma equiparable durant el desenvolupament dels cultius de neurones hipocampals dels diferents genotips analitzats, tal i com s'observa per l'expressió del marcador dendrític MAP2 (Fig.69).

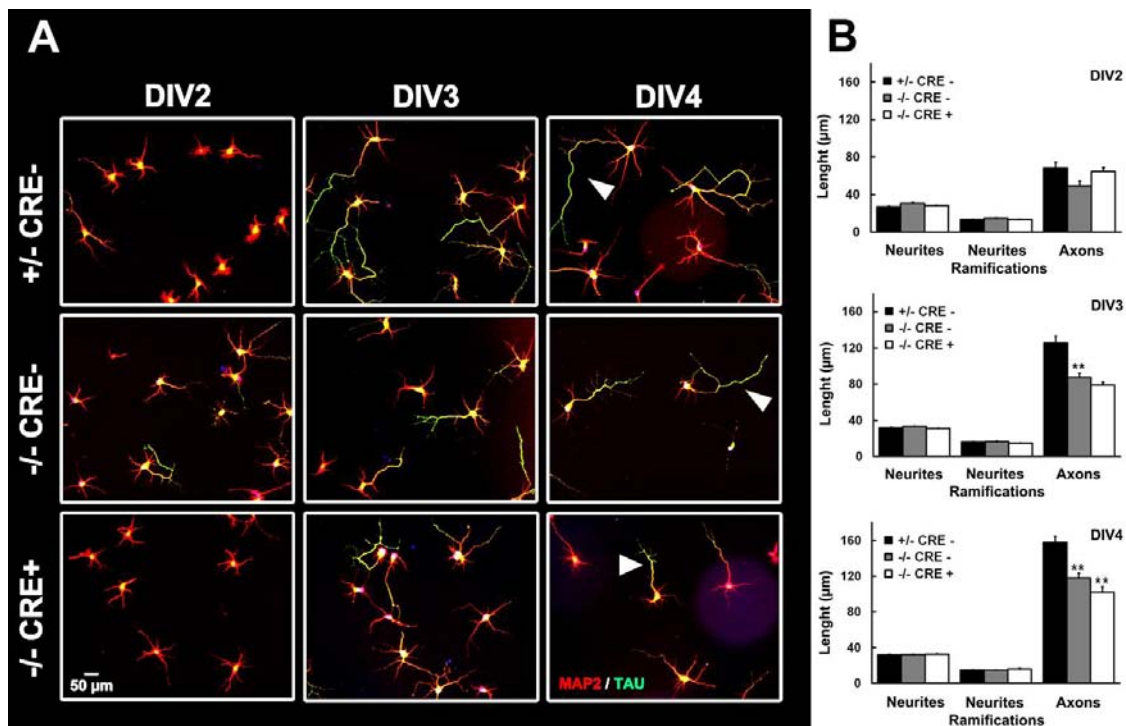


Figura 70. Reducció de l'elongació axonal durant el desenvolupament de neurones embrionaries $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ i $PDK1^{-/-}Cre^{+}$. (A) Imatges representatives de cultius de neurones hipocampals dels corresponents genotips i en els DIV indicats que han estat tenyides amb el marcador específic d'axó Tau-1 i el dendrític MAP2. (B) Representació gràfica de la longitud tant de les neurites i les seves ramificacions com la dels axons de les neurones hipocampals al llarg dels diferents DIV pels corresponents genotips. Les fletxes indiquen l'axó visible en verd amb el marcador Tau-1. Els resultats procedeixen de l'anàlisi de les imatges representatives de l'apartat anterior i es tradueixen gràficament com la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana que inclou 100 neurones procedents de 3 embrions independents per a cada condició.

Els defectes a nivell de polarització de les neurones hipocampals $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ i $PDK1^{-/-}Cre^{+}$ es veuen acompanyats per una alteració dels processos d'elongació axonal, amb reduccions de la longitud de l'axó d'una forma genotip dependent durant els DIV3 i 4, que corresponen a les etapes més tardanes del desenvolupament *in vitro* (Fig.70).

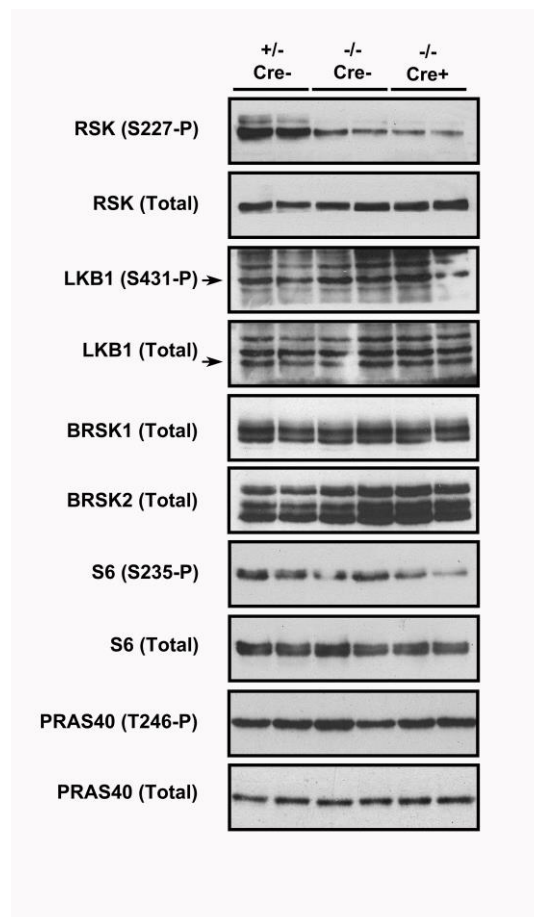


Figura 71. Activació equiparable de l'eix PKB-mTORC1-BRSKs durant el desenvolupament dels embrions $PDK1^{-/-}Cre^{+}$. Resolució per Western Blot d'extractes proteics procedents de cervells corresponents al embrions dels genotips indicats a dia E15.5. Es detecta específicament la fosforilació i la quantitat de les proteïnes indicades amb els corresponents anticossos.

Aquests defectes a nivell de polarització neuronal i elongació axonal associats a la inhabilitació del PIF-pocket de PDK1 sembla ser que no depenen de l'acció d'mTORC1 sobre l'expressió de proteïnes implicades en aquests processos, com BRSK1 i 2, ni de la seva activació via LKB1 (Fig.71). D'altra banda, el domini PH de PDK1 sí que juga un paper clau, a través de l'eix PKB/mTORC1,

en la regulació de l'expressió de BRSK1 i 2 associada als processos de desenvolupament neuronal (Zurashvili et al., 2013)

4.1 mTORC2 i S6K es troben implicats en la polarització neuronal i l'elongació axonal

A partir dels resultats anteriors i de forma similar al que havia succeït amb l'anàlisi de les respostes de viabilitat cel·lular, se'ns presentava la qüestió de definir quines quinases dependents del PIF-pocket de PDK1 es trobaven implicades en els processos de desenvolupament neuronal associats a la via de la PI3K. Per això vàrem establir cultius primaris de neurones hipocampals en medi complet tractades amb diferents inhibidors de la via de la PI3K i de les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1, a fi d'estudiar els processos de diferenciació en dos estadis diferents del desenvolupament neuronal, els corresponents DIV2 i DIV4.

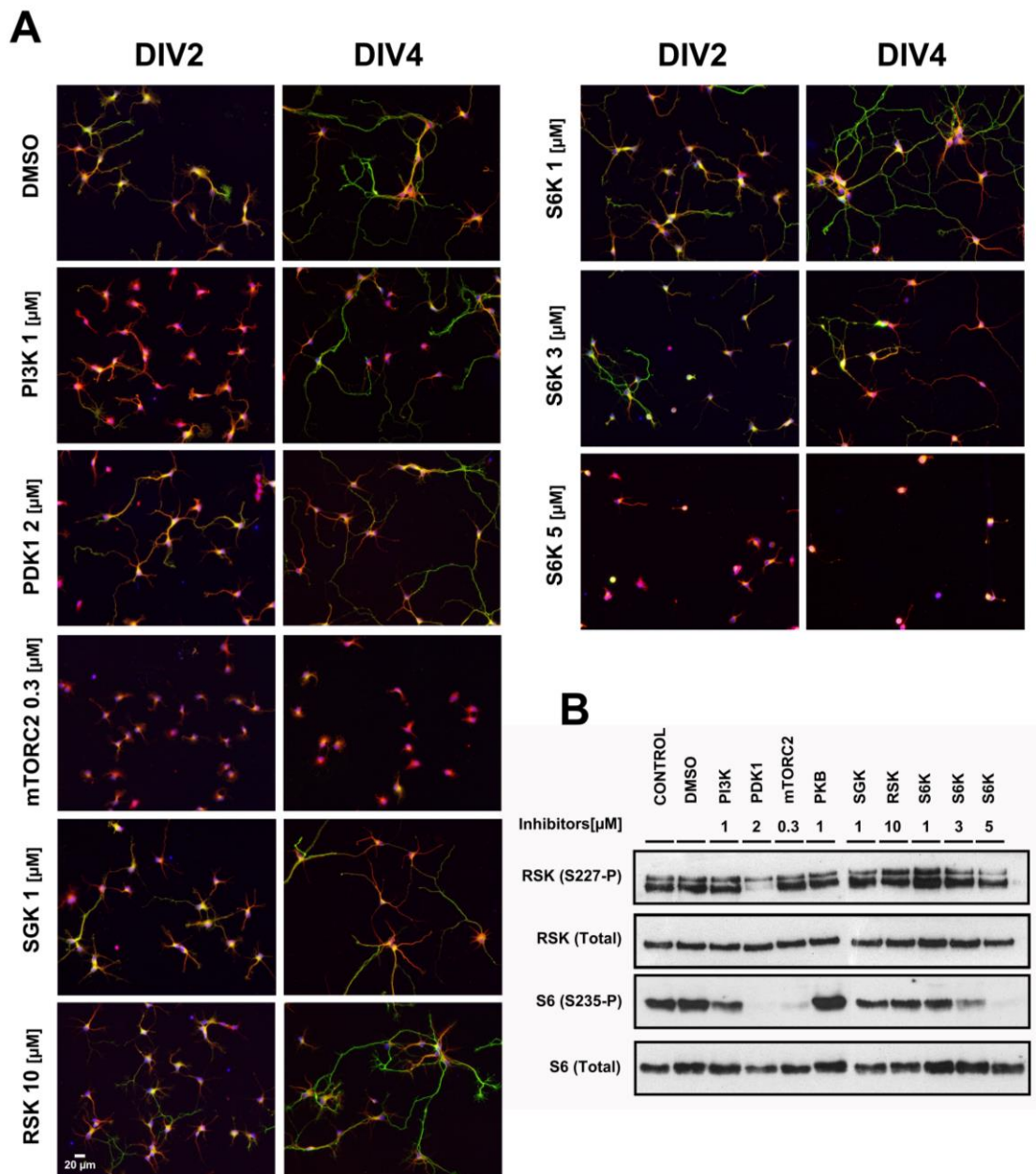


Figura 72. La via de la PI3K-PDK1 controla a través de S6K la polarització neuronal i l'elongació axonal. (A) Imatges representatives de cultius de neurones hipocampals tractats a les dosis establertes dels diferents inhibidors als DIV indicats. Les neurones hipocampals han estat tenyides amb el marcador específic d'axó Tau-1 i el dendrític MAP2. (B) De forma paral·lela, diferents cultius primaris de neurones hipocampals varen ser tractats com en l'apartat anterior. Els tractaments CONTROL representen aquelles neurones hipocampals que no han estat tractades amb cap inhibidor i els DMSO corresponen a aquelles neurones cultivades amb una dilució d'aigua i DMSO a fi de veure l'efecte del dissolvent dels diferents inhibidors en els processos analitzats. Els extractes proteics obtinguts varen ser resoltos per Western Blot i es va monitoritzar la quantitat i el grau d'activació de les diferents quinases

detectant, de forma específica, els seus residus d'activació amb els corresponents fosfoanticossos.

Els inhibidors de RSK, SGK i S6K a 1 μ M no comporten alteracions en la polarització neuronal ni en l'elongació axonal quan es compara amb les neurones hipocampals control tractades amb DMSO. Per contra, les neurones hipocampals tractades amb inhibidors de quinases més apicals de la via, com són PI3K i PDK1, presenten una reducció del nombre de neurones polaritzades a DIV2 i un lleuger dèficit en l'elongació axonal a DIV4 respecte el control. El dèficit de neurones polaritzades en presència de l'inhibidor de PI3K s'agreuja al tractar les neurones hipocampals amb l'inhibidor d'mTORC2. Aquest inhibidor comporta la inhabilitació de l'axonogènesi a DIV2, mentre que a DIV4 les neurones es caracteritzen per restar quiescents en l'etapa del desenvolupament on només presenten una gran lamelipòdia. D'altra banda, dosis creixents de l'inhibidor de S6K comporten una inhabilitació de la polarització que és encara més acusada que l'observada amb els inhibidors de PI3K i d'mTORC2. Com a conseqüència, no es forma la lamelipòdia a DIV2 i comporta, a més a més, una reducció dosis dependent de l'axonogènesi i l'elongació axonal a DIV4. Aquest fet implica una inhibició total del procés de diferenciació observat a les dosis màximes que comprometen també la viabilitat neuronal (Fig.72A).

Totes les alteracions a nivell de polarització i elongació axonal que hem pogut observar en els cultius de neurones hipocampals amb els inhibidors de PI3K, PDK1 i mTORC2 es troben associades a reduccions en la fosforilació de la proteïna S6. Aquest escenari es confirma en observar com els defectes en el desenvolupament de les neurones hipocampals s'agregen de forma proporcional a les dosis creixents de l'inhibidor de la S6K, i inversament proporcional a la fosforilació del seu substrat S6 (Fig.72B).

4.2 La via de la PI3K participa a través de la S6K en la consolidació de la sinapsis

La via de la PI3K també regula la formació, la consolidació i la plasticitat de les sinapsis a través de la síntesi local de proteïnes com a demanda als diferents estímuls extracel·lulars; i aquest procés es desenvolupa de forma dependent

d'mTORC1 i el seu substrat, la S6K. Per això i tenint en compte els resultats anteriors, vàrem realitzar els mateixos tractaments en cultius primaris de neurones hipocampals establerts durant 22 DIV, temps suficient per donar-se la sinaptogènesi i l'establiment de la comunicació neuronal. Per analitzar amb determinació l'estat de la sinapsis ens vàrem focalitzar en l'estudi, amb tècniques d'immunocitoquímica, de la proteïna PSD95, indispensable per la consolidació de la comunicació neuronal a nivell postsinàptic, i que fou contrastada amb el marcador dendrític MAP2. D'altra banda, vàrem analitzar bioquímicament l'estat de la neurona presinàptica mesurant per Western blot els nivells d'expressió de la proteïna indispensable per l'alliberació dels neurotransmissors, la sinaptofisina; així com també l'estat de les interneurons gabaèrgiques, indispensables per la modulació de la sinapsis, mesurant els nivells de l'enzim GAD67, que catalitza la conversió de glutamat al neurotransmissor inhibitori GABA.

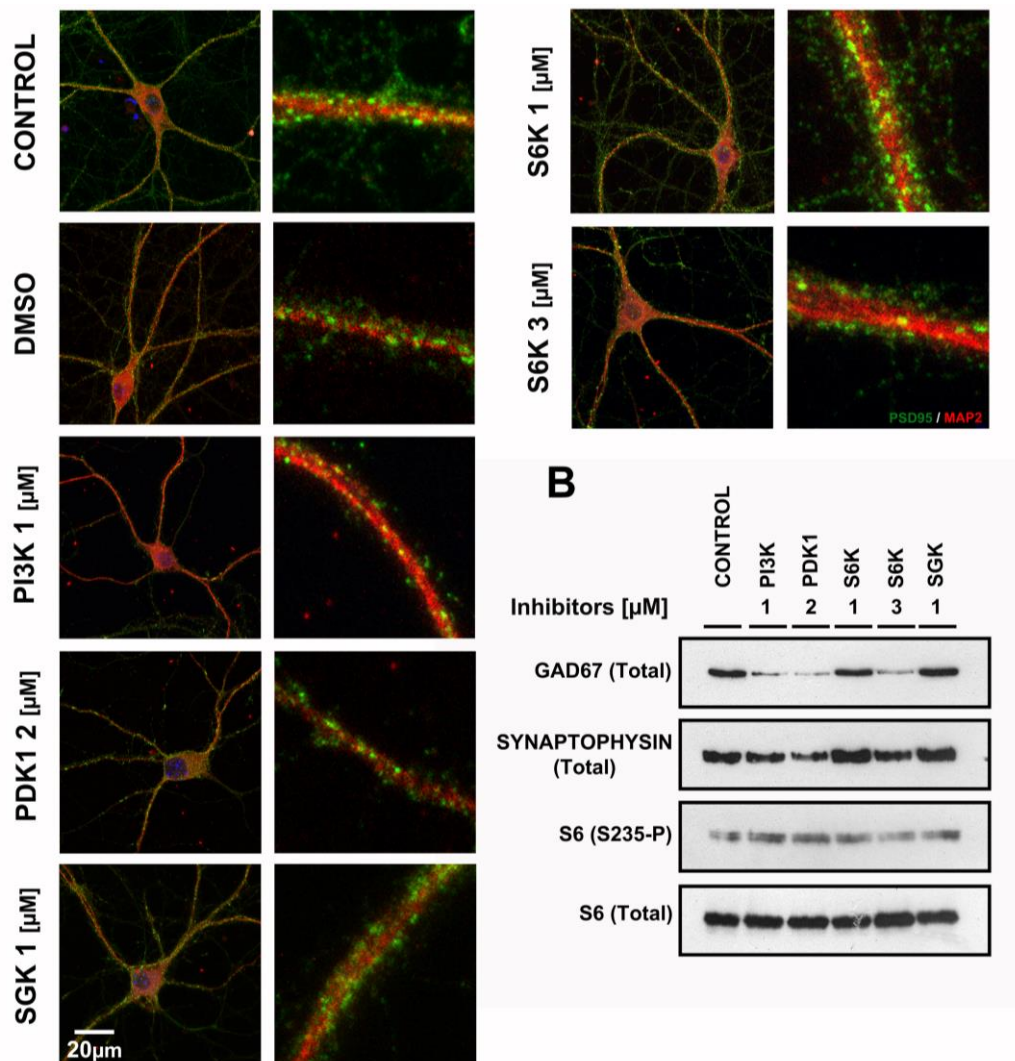


Figura 73. S6K actua com a quinasa efectora de la via de la PI3K-PDK1 en la consolidació sinàptica. (A) Imatges representatives de cultius de neurones hipocampals tractats a les dosis establertes dels diferents inhibidors fins al DIV22. Les neurones han estat tenyides amb el marcador postsinàptic PSD95 i el dendrític MAP2. Les imatges de la columna de la dreta corresponen a ampliacions de les dendrites de les imatges de la columna de la dreta. (B) De forma paral·lela, diferents cultius primaris de neurones hipocampals varen ser tractats com en l'apartat anterior. Els extractes proteics obtinguts varen ser resoltos per Western Blot i es va monitoritzar tant la quantitat com l'activació de les diferents proteïnes implicades en la sinapsis detectant-les, de forma específica, amb els corresponents anticossos.

Els inhibidors de PDK1 i de PI3K comporten una reducció en la localització presinàptica de PSD95. Aquesta reducció també es dona de la mateixa manera amb l'inhibidor de S6K, d'una forma dosis dependent. A més a més, aquest dèficit en la localització dendrítica de PSD95 va acompanyada bioquímicament d'una disminució en l'expressió de la sinaptofisina i de l'enzim GAD67 específic

d'interneurones gabaèrgiques (Fig.73A). Contràriament a l'experiment anterior, la fosforilació de la S6 es manté de forma equiparable en presència dels diferents inhibidors, possiblement a causa de l'extensa durada dels tractaments. De fet, al llarg dels 22 dies es substitueix la meitat del medi per medi nou que inclou nutrients, dels quals les neurones hipocampals obtenen ATP que es capaç de desplaçar l'inhibidor ATP competitiu de la S6K, restaurant així l'activitat catalítica d'aquesta quinasa. D'altra banda, utilitzem dosis submàximes d'aquest l'inhibidor, ja que a partir de 5 μ M, com hem esmentat anteriorment, afecta a la supervivència de les neurones hipocampals a DIV4 i provoca la mort de gairebé totes les neurones a DIV22 (Fig.73B).

5. Alteració fisiològica en el cervell dels ratolins PDK1^{-/-}Cre⁻ i PDK1^{-/-}Cre⁺

A partir de tots els resultats obtinguts ex-vivo, vàrem voler explorar la rellevància de l'alteració funcional de les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1 en la fisiologia del cervell adult.

5.1 Reducció en la densitat de fibres axonals del còrtex i de l'hipocamp

L'anàlisi immunohistoquímic de mostres de cervells dels diferents genotips inclosos en parafina i tenyits amb el marcador dendrític MAP2 i el de neurofilaments SMI312, ens mostren una reducció en la densitat de fibres axonals corresponent a les capes IV i VI del còrtex somatosensorial i a les regions del CA1 i el gir dentat de l'hipocamp, que és proporcional al grau d'expressió de la proteïna mutant PDK1 L155E (Fig.74).

Figura 74. Reducció de la densitat de fibres axonals en els ratolins PDK1^{-/-}Cre⁻ i PDK1^{-/-}Cre⁺. (A) Imatges d'epifluorescència del còrtex somatosensorial de talls coronals de 5 μ m de gruix procedents de cervells de ratolins adults dels genotips indicats. S'han identificat les dendrites amb el marcador MAP2, els axons amb el marcador de neurofilaments SMI312 i els nuclis amb el colorant nuclear Hoechst. Les imatges solapades dels tres marcadors es mostren com a Merged al final de cada panell representatiu del corresponent genotip. Les capes corticals des de la I a la VI es troben indicades a la dreta de la imatge. (B) Ampliació a 20X de les capes IV i VI del còrtex somatosensorial, així com també, del gir dentat, la regió CA3 i la CA1 de l'hipocamp observables en talls tenyits amb SMI312 i Hoechst. Les fletxes indiquen la diferència en la densitat de fibres axonals entre els diferents genotips.

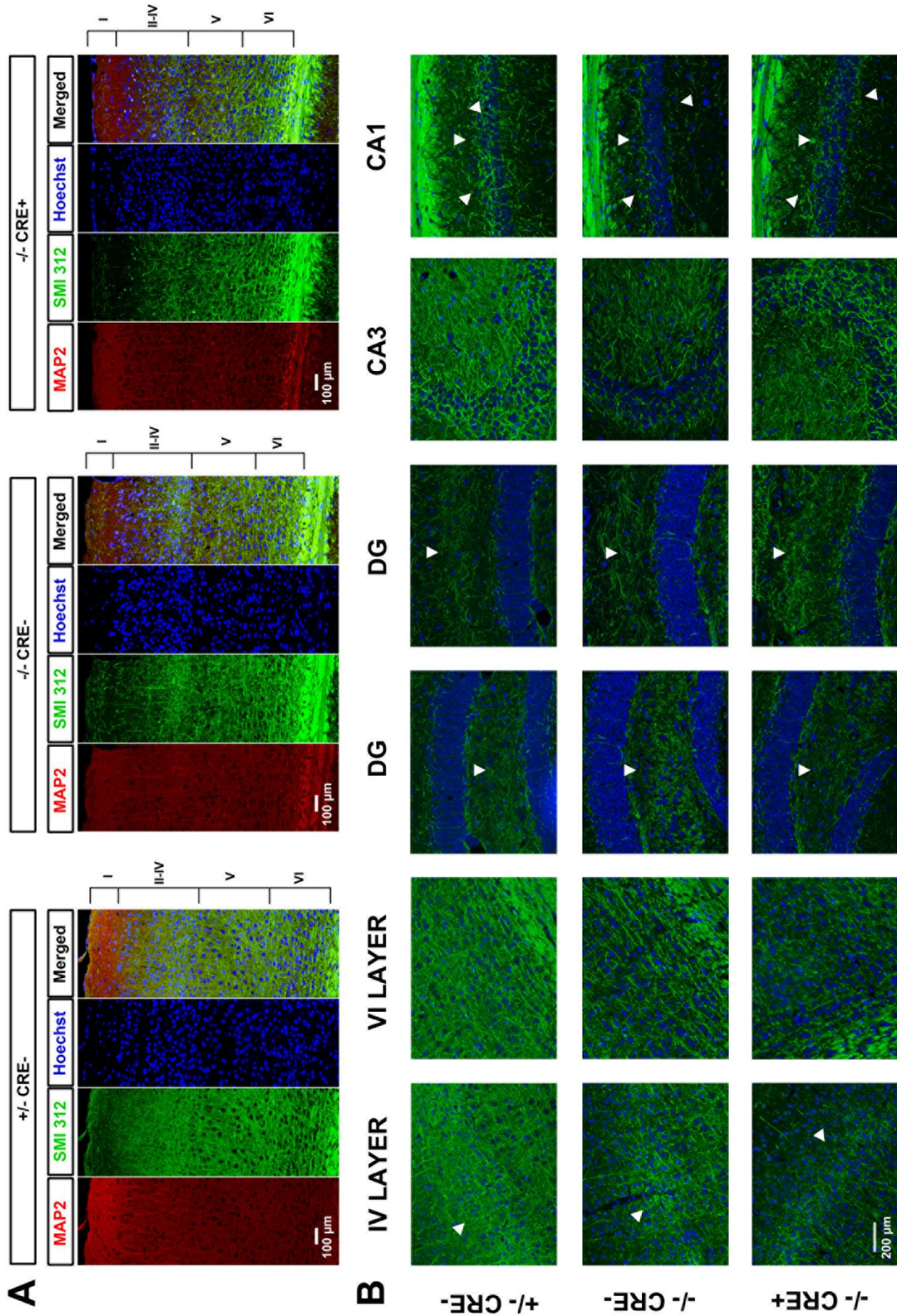


Figura 74

5.2 Compactació neuronal en la quarta capa del còrtex

Aquesta alteració en la densitat de fibres neuronals ens va portar a pensar que no fos causada per una reducció en el nombre de neurones, i a fi de resoldre-ho vàrem analitzar el còrtex somatosensorial i l'hipocamp de ratolins adults a partir de talls impregnats amb el marcador neuronal NeuN i el marcador nuclear Hoechst, així com també contrastant-ho amb una tinció hematoxilina eosina en talls adjacents de les corresponent regions.

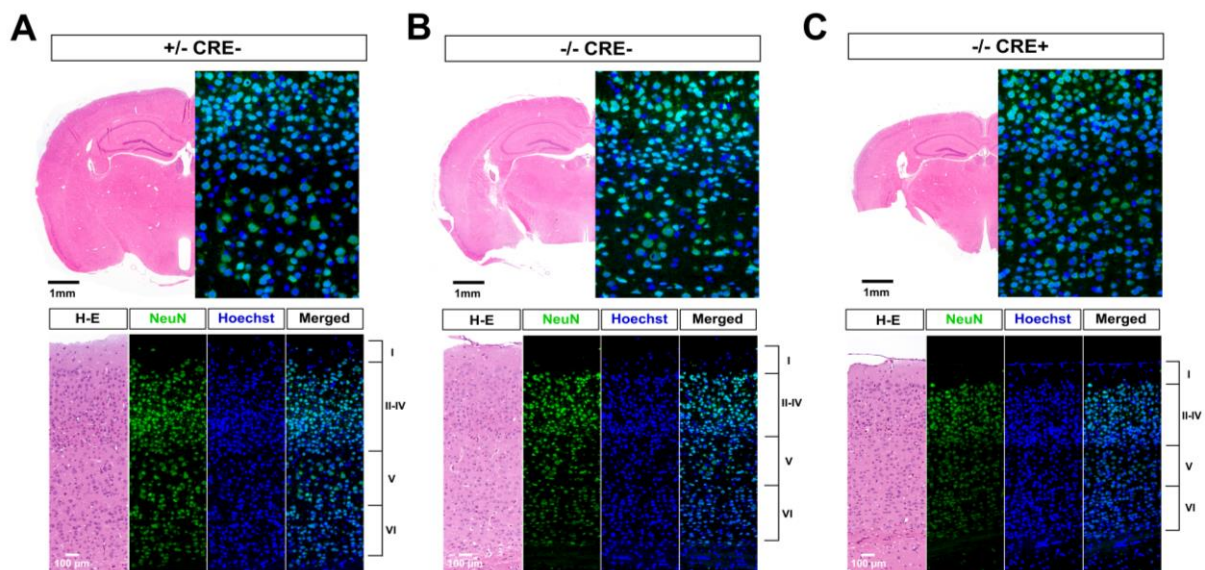


Figura 75. Compactació sense pèrdua de les neurones de la capa IV del còrtex associada a la mutació del domini PIF-pocket de PDK1. (A-C) Imatges del còrtex somatosensorial procedents de talls coronals de 5 µm de gruix de cervells de ratolins adults pels genotips indicats que han estat processats per la tinció Hematoxilina-Eosina (H-E) o per tècniques d'epifluorescència basades en el marcatge neuronal amb NeuN i els nuclis amb el colorant nuclear Hoechst. Les imatges solapades dels dos marcadors es mostren com a *Merged* al final de cada panell. Les capes corticals des de la I a la VI es troben indicades a la dreta de la imatge. En els blocs corresponents a cada genotip podem apreciar una imatge a 2X d'un hemisferi corresponent als talls dels cervells tenyits amb H-E (marge superior esquerra) i una ampliació de les capes superiors del còrtex somatosensorial de talls tenyits amb els marcadors NeuN i Hoechst (marge superior dret).

Malgrat no presenciar canvis substancials en el nombre de neurones, vàrem poder apreciar un increment en la compactació de les neurones que conformen les capes més superficials del còrtex, que un cop més resulta proporcional als nivells d'expressió de la proteïna mutant de PDK1 (Fig.75). D'altra banda,

l'hipocamp presentava una lleugera reducció en la mida de les neurones que conformen les regions CA3, CA1 i el gir dentat en mostres procedents de ratolins PDK1^{-/-}Cre⁺ (Fig.76).

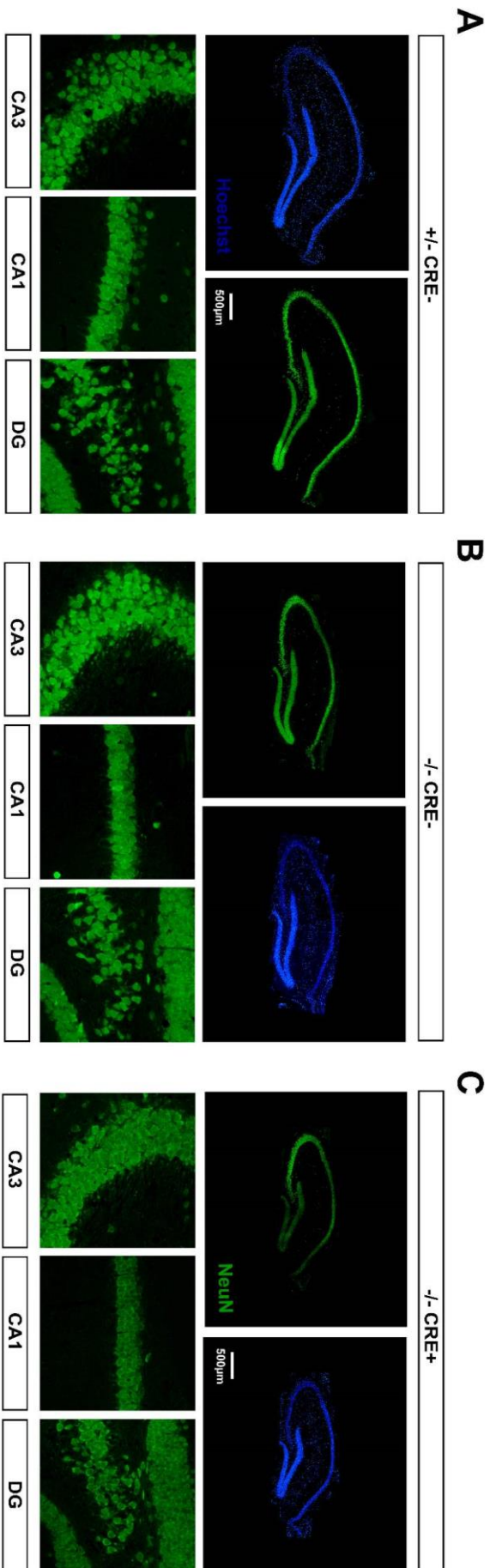


Figura 76. La mutació del domini PIF-pocket de PDK1 no comporta una reducció en el nombre de neurones hipocampals. Imatges de difluorescència procedents de talls coronals de 5 µm de gruix de l'hipocamp de ratolins adults dels genotips indicats tenint amb el marcador neuronal NeuN i el colorant nuclear Hoechst. Es mostra la reconstrucció de l'hipocamp a 20x (panells superiors) i les imatges representatives de tres de les seves regions: CA1, CA3 i gir dentat (DG) (panells inferiors).

5.3 Canvis en la distribució cortical d'algunes poblacions d'interneurones

Les capes II, III i IV engloben la regió més superficial del còrtex i estan conformades principalment per neurones piramidals o glutamatèrgiques i diferents poblacions d'interneurones gabaèrgiques. A fi de determinar quin tipus neuronal presentava alteracions en les capes corticals del ratolí mutant vàrem analitzar el patró de marcatge del factor de transcripció CUX1, específic de neurones glutamatèrgiques; així com també de la parvoalbúmina, marcador de poblacions d'interneurones com les Basket cells o les Chandelier cells, presents en les capes més superficials del còrtex.

La compactació neuronal de les capes més superficials del còrtex es reproduïx amb el marcador de neurones glutamatèrgiques CUX1 d'una forma genotip dependent, demostrant-nos que aquest fenomen era específic d'aquest tipus neuronal en particular i com a conseqüència d'un augment regional de la densitat de neurones piramidals (Fig.77C). D'altra banda, al analitzar la població d'interneurones parvoalbúmina positives, observem que s'exclouen de la capa IV del còrtex somatosensorial d'una forma proporcional a la compactació de les neurones glutamatèrgiques i de forma correlacionada a l'abundància de la proteïna mutant de PDK1 en els tres genotips analitzats (Fig.77A).

Figura 77. Compactació de les neurones piramidals i exclusió de les interneurones gabaèrgiques en la capa IV del còrtex associada a la mutació del domini PIF-pocket de PDK1. (A) Imatges d'epifluorescència procedents de talls coronals de 5 μm de gruix a nivell del còrtex somatosensorial procedents de cervells de ratolins adults pels corresponents genotips. S'han identificat les neurones glutamatèrgiques de les capes corticals superiors amb el marcador CUX1, les poblacions d'interneurones gabaèrgiques parvoalbúmina positives amb anticossos específics contra aquesta proteïna, i els nuclis amb el colorant nuclear Hoechst. Les imatges solapades dels tres marcadors es mostren com a Merged al final de cada panell representatiu del corresponent genotip. Les capes corticals des de la I a la VI es troben indicades a la dreta de la imatge. (B) Imatge representativa d'un tall coronal de cervell de ratolí adult tenyit amb el colorant nuclear Nissl on el requadre ens indica la regió del còrtex d'on s'han obtingut les imatges de l'apartat anterior. La imatge s'ha extret de l'Allan Brain Atlas i correspon a la posició 256 del cervell de ratolí P56 (postnatal 56). (C) La densitat de neurones CUX1 positives en la capa IV compatibilitzades com a nombre de cèl·lules per μm^2 pels corresponents genotips i (D), el nombre total de neurones glutamatèrgiques de la capa IV respecte les capes

superiors del còrtex expressat com a percentatge de neurones d'aquesta capa respecte la resta de neurones que conforme les capes més apicals. Els resultats procedeixen de l'anàlisi de les imatges representatives de l'apartat anterior i es tradueixen gràficament com la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana.

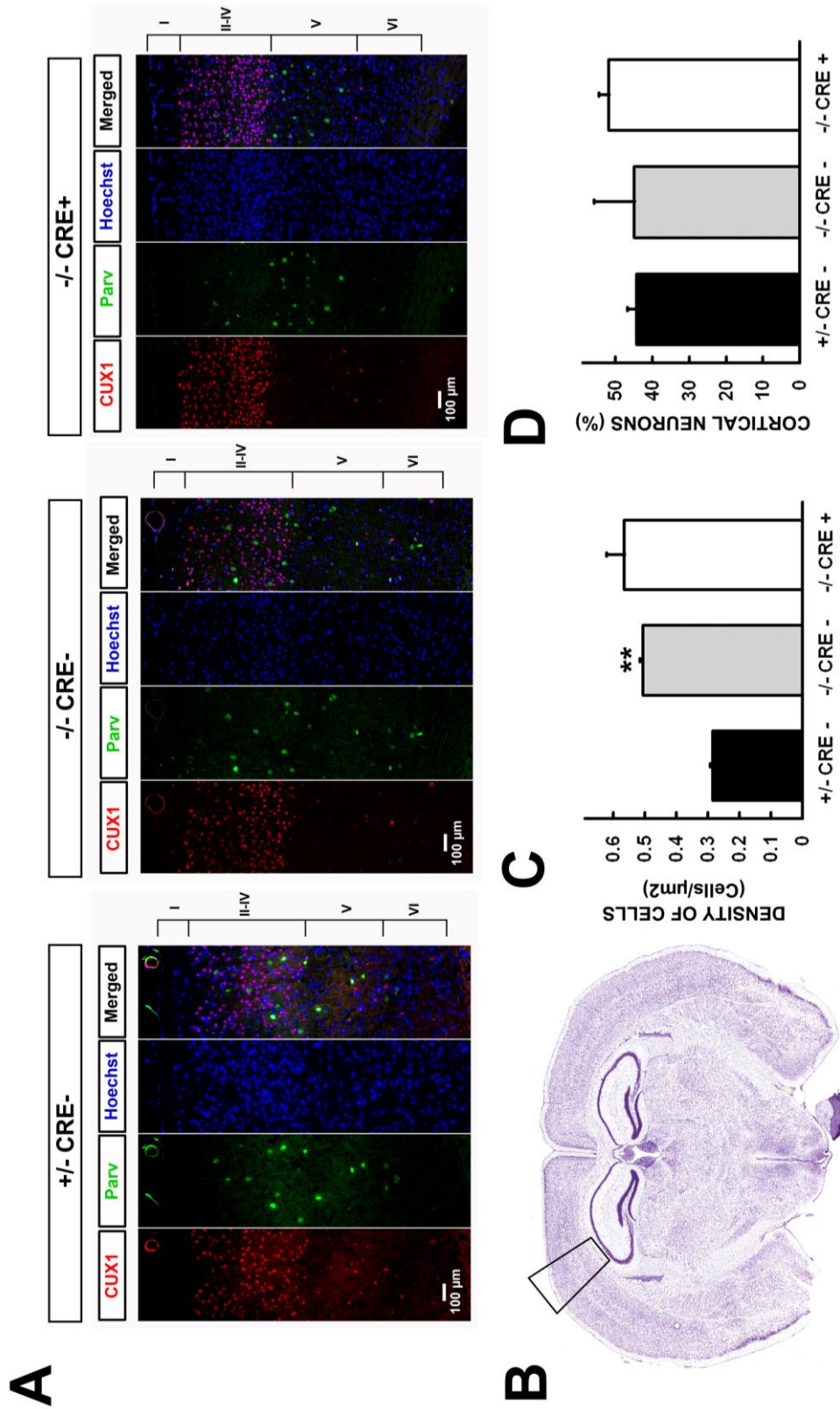


Figura 77

5.4 Impacte de la mutació del PIF-pocket de PDK1 en l'activitat de les interneurons gabaèrgiques del còrtex somatosensorial i cingulat.

A partir d'aquí vàrem voler saber si la deslocalització de les interneurons d'aquesta zona del còrtex respecte les neurones glutamatèrgiques comportaria una disfunció en la comunicació entre les poblacions d'aquests dos tipus neuronals. Per resoldre aquesta qüestió plantejada vàrem analitzar l'enzim GAD67, específic de les interneurons gabaèrgiques, que catalitza la conversió del glutamat al neurotransmissor inhibitor de les neurones piramidals, GABA.

Els resultats ens mostren un reducció de la intensitat del marcatge GAD67 en les capes III-IV i també la V del còrtex somatosensorial (Fig.78) que es reproduïx en les capes II/III i la V d'altres regions més rostrals del cervell com és el cas del còrtex cingulat (Fig.79).

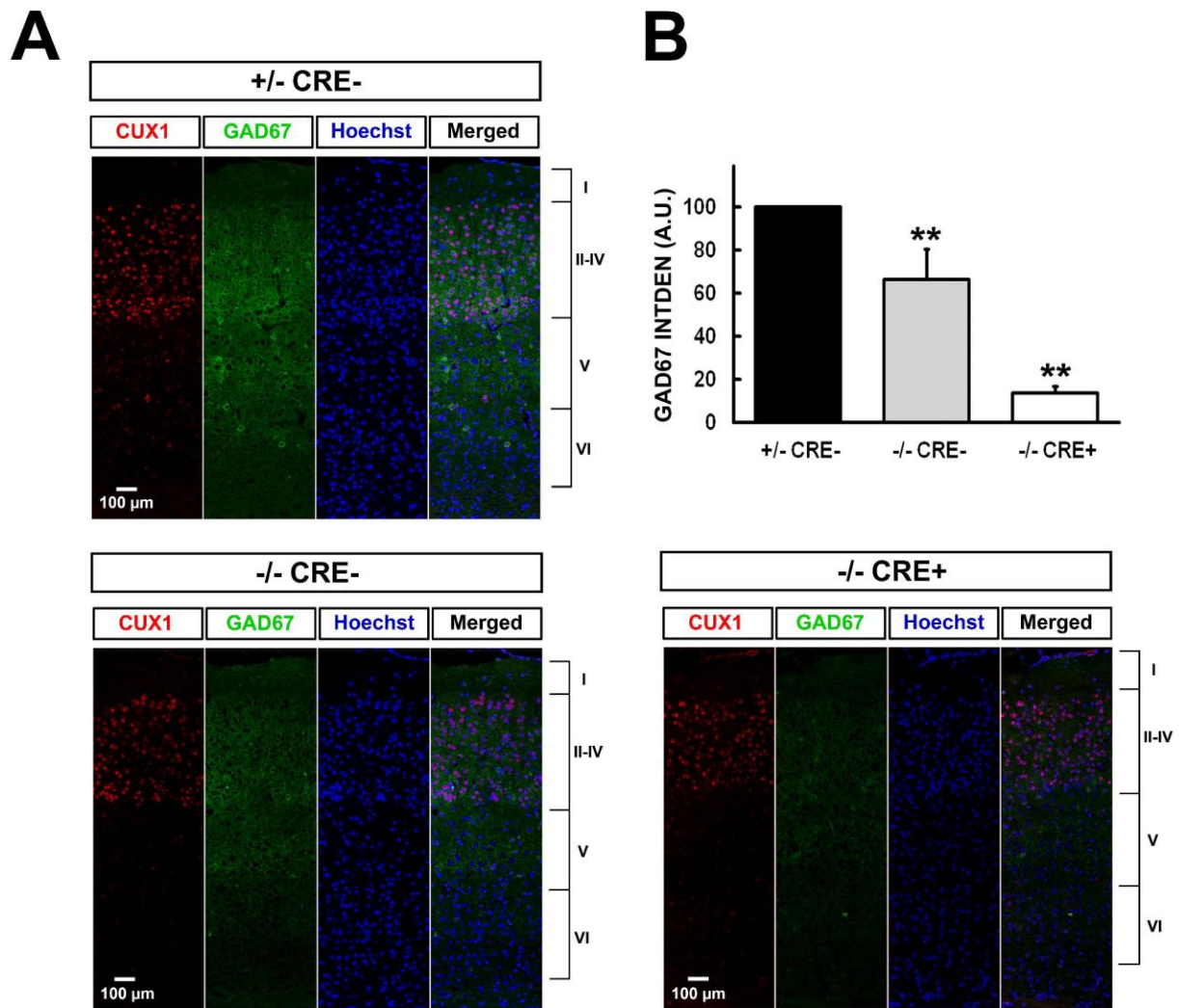


Figura 78. Reducció de GAD67 inversament proporcional a l'expressió de proteïna mutant de PDK1 en el còrtex somatosensorial. (A) Imatges d'epifluorescència procedents de talls coronals de 5 μ m de gruix a nivell del còrtex somatosensorial de cervells de ratolins adults pels corresponents genotips. S'han identificat les neurones glutamatèrgiques de les capes corticals superiors amb el marcador CUX1, s'ha monitoritzat de forma indirecta l'activitat de les poblacions d'interneurons gabaèrgiques amb anticossos específics contra GAD67, i tenyit els nuclis amb el colorant nuclear Hoechst. Les imatges solapades dels tres marcadors es mostren com a Merged al final de cada panell representatiu del corresponent genotip. Les capes corticals des de la I a la VI es troben indicades a la dreta de la imatge. (B) La intensitat de la proteïna GAD67 detectada va ser quantificada a partir de 3 seccions cerebrals independents per cada embrió d'un total de tres embrions per genotip. Els resultats procedeixen de l'anàlisi de les imatges representatives de l'apartat anterior i es tradueixen gràficament com la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana.

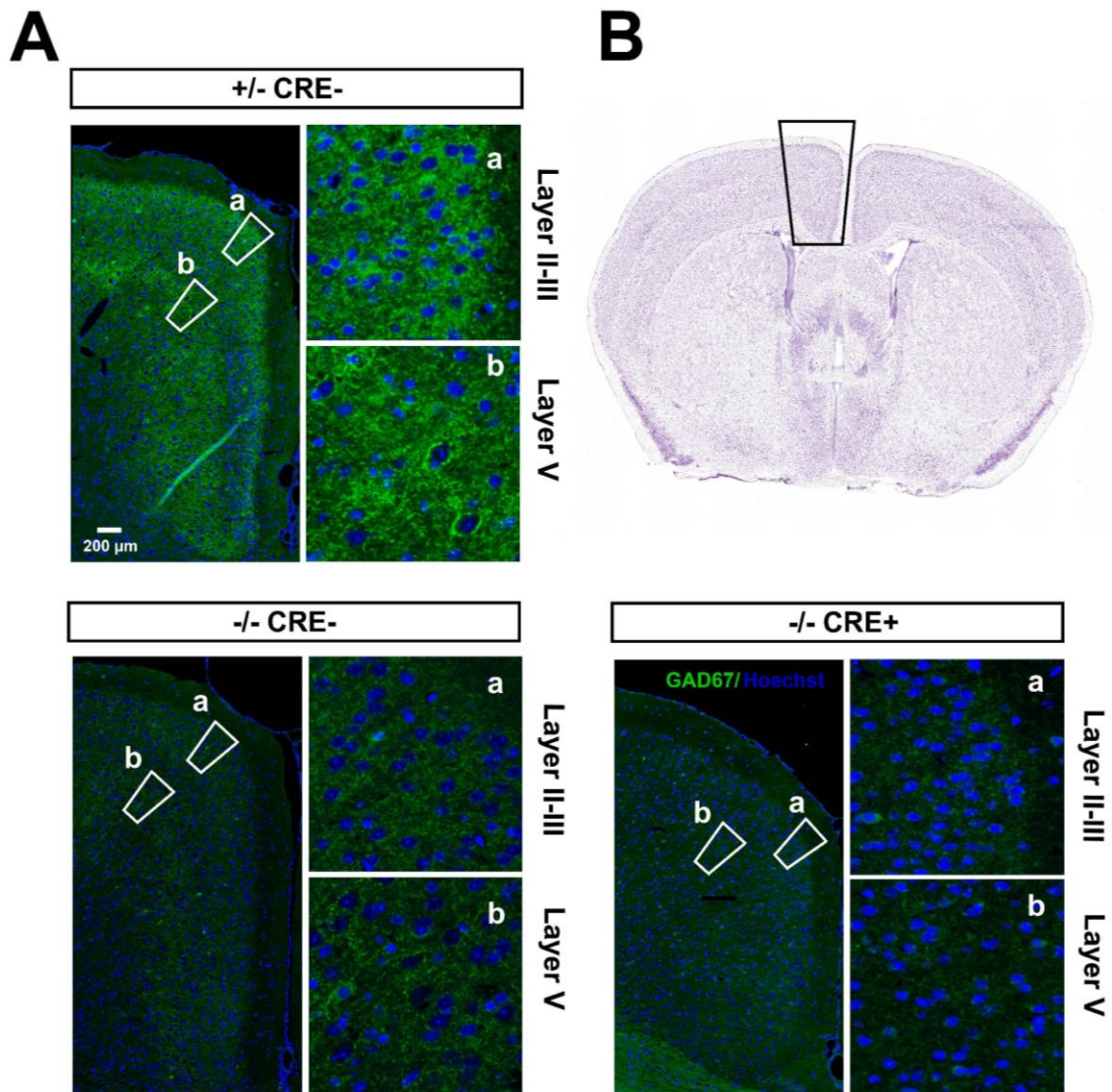


Figura 79. Reducció dels nivells d'expressió de GAD67 inversament proporcional a l'expressió de proteïna mutant de PDK1 en el còrtex cingulat. (A) Imatges d'epifluorescència del còrtex cingulat procedents de talls coronals de 5 μ m de gruix de cervells de ratolins adults pels corresponents genotips. S'ha monitoritzat de forma indirecta l'activitat de les poblacions d'interneurones gabaèrgiques amb anticossos específics contra GAD67 i tenyit els nuclis amb el colorant nuclear Hoechst. Els requadres blancs a i b mostren la procedència de les regions ampliades corresponents a les capes corticals que s'indiquen als panells de la dreta. (B) Imatge representativa d'un tall coronal de cervell de ratolí adult tenyit amb el colorant nuclear Nissl on el requadre ens indica la regió del còrtex d'on s'han obtingut les imatges de l'apartat anterior. La imatge s'ha extret de l'*Allan Brain Atlas* i correspon a la posició 218 del cervell de ratolí P56 (postnatal 56).

6. Desordres cognitius i de conducta en ratolins PDK1^{-/-}Cre⁻ i PDK1^{-/-}Cre⁺

A fi d'avaluar si aquests defectes bioquímics i histològics, resultants de la mutació del PIF-pocket de PDK1 i d'una forma gradual dependent del genotip, es traslladaven en trastorns de la conducta dels ratolins; s'els va aplicar un protocol anomenat SHIRPA que consisteix en obtenir un informe general de les capacitats sensorimotors i cognitives del ratolí basades en l'anàlisi de la seva condició física, les funcions sensorimotors, la conducta i el perfil psicològic, així com també l'estat cognitiu (Rogers et al., 1997).

Els ratolins PDK1^{-/-}Cre⁺ presentaven una reducció del creixement somàtic, mesurat a partir del pes corporal, que s'associava amb una tendència a la baixa a l'hora d'alimentar-se (Fig.80A). També presentaven reduïdes les seves capacitats sensorimotors, observables en el *Wood rod test* i el *Wire hang test* que es basen en la realització d'activitats que impliquen la coordinació motora i l'equilibri (Fig.80B); i la capacitat de desenvolupar tasques diàries com la nidificació, mostrant una afectació de les funcions executives i de supervivència de l'individu, protecció de la seva descendència i de l'estructura familiar associades a aquesta activitat (Fig.80C) (Torres-Lista and Giménez-Llort, 2013).

Amb els tests de *Neophobia in the corner* i l'*Open field* es valora la capacitat exploratòria i d'ansietat d'un ratolí davant d'un nou ambient. No presenten alterada la *thigmotaxis* (Simon et al., 1994), que consisteix en el nombre de vegades que van o la distància que recorren a la perifèria del camp obert respecte al centre on es senten desprotegits; però sí mostren una reducció en l'activitat exploratòria vertical o *rearings* que es tradueix en un increment del temps que queden paralitzats al centre de l'ambient nou (Fig.80E). Aquesta capacitat exploratòria associada a un cert nivell de desmotivació s'observa també en realitzar el *Marble-burying test*, on presenciem una reducció en el temps que interaccionen amb les caniques i un major nombre de peces que es trobem canviades o semienterrades respecte els ratolins control, que executen la tasca de forma més eficaç (Fig.80F).

Utilitzem el Water Maze Test per valorar possibles dèficits en memòria, concretament short term memory (STM) i long term memory (LTM). Els ratolins PDK1^{-/-}Cre⁺ presenten una major dificultat tant a l'hora d'aprendre a trobar la plataforma visible (Cue1-Cue4), com en trobar-la quan es troba submergida i es repeteix l'experiment a les 24 i les 48 hores (PT11-PT14/PT21-PT24). Contràriament els ratolins dels diferents genotips resolen de forma equivalent la tasca de trobar la plataforma per primera vegada en les diferents situacions. A més a més, les característiques d'aquest test generen una situació d'estrés al ratolí que permet observar com els ratolins PDK1^{-/-}Cre⁺ la gestionen, augmentant l'incidència d'episodis de flotació (Fig.80G). Aquest comportament, sumat al d'evitar la seva manipulació o la realització del *Hanger Test* entre d'altres comportaments bizarres es veuen incrementats en els ratolins que expressen la mutació del PIF-pocket de PDK1 a sistema nerviós central (Fig.80D). També es mostra una desmotivació i por davant dels diferents graus d'estrés que generen els diferents tests, que es tradueix en una augment del nombre de defecacions i urinades, el temps de paràlització en el test de l'*Open field* i els episodis de flotació en el test del *Morris Water Maze*.

L'activitat motora associada al seu ritme circadià es va valorar amb una actimetria que consistia en mesurar el nombre de voltes que realitzaven en una roda incorporada en la caixa on residien. En general tots els ratolins presentaven una activitat locomotora alta durant la nit i baixa al llarg del dia, però els ratolins PDK1^{-/-}Cre⁺ experimentaven una disminució de la seva activitat motora sobretot durant els dos primers dies i es mantenia fins les 84 hores que durava l'experiment (Fig.80H).

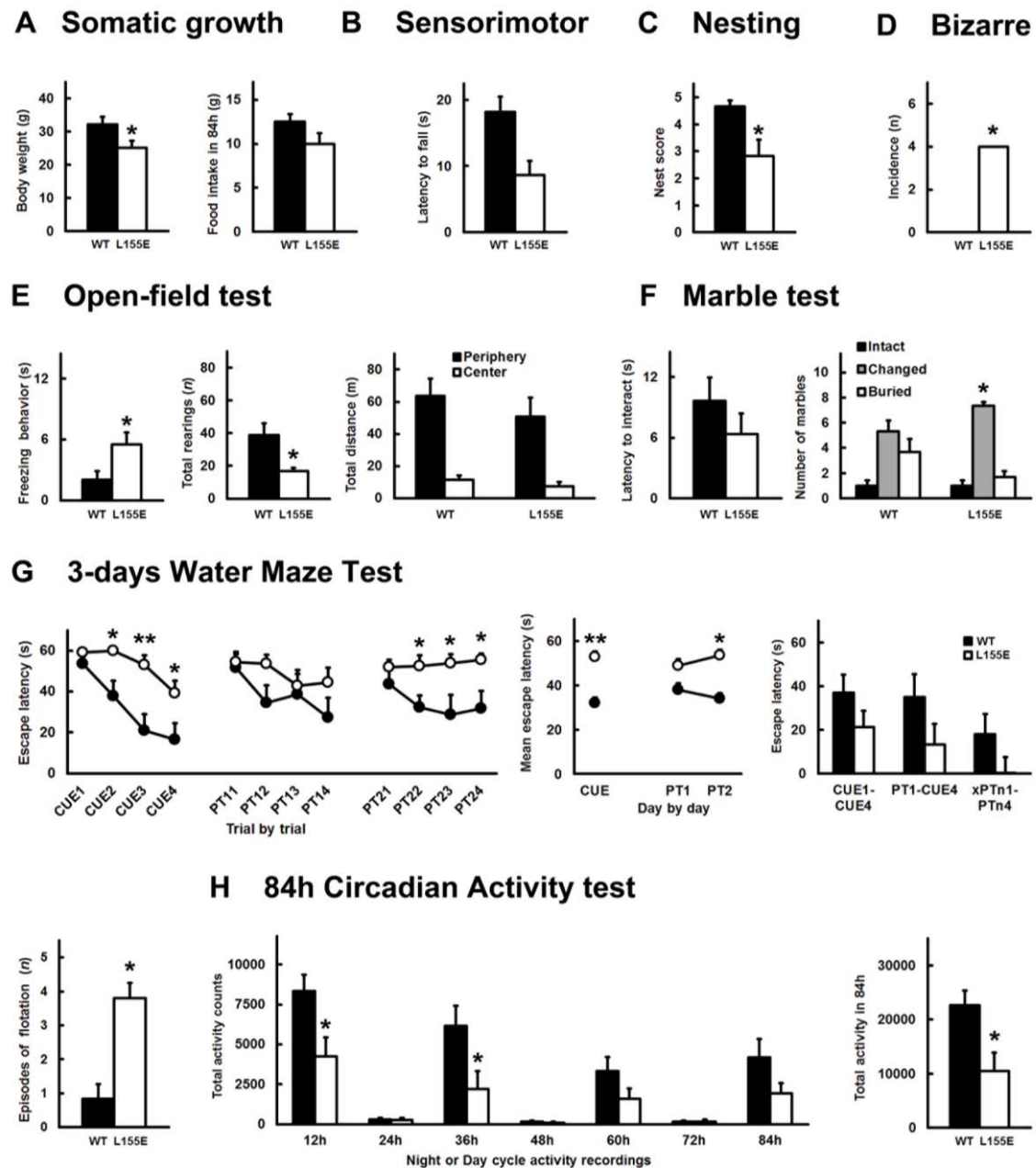


Figura 80. Anàlisi conductual genèric dels ratolins $PDK1^{-/-}Cre^{+}$. (A-H) Els paràmetres associats al creixement somàtic i a l'alimentació dels ratolins (A), les capacitats sensorimotors desenvolupades en el Wood Rod Test (B), les funcions executives i de supervivència observables en les tasques diàries de nidificació (C), la incidència de comportaments bizarres (D), l'activitat exploratòria i de comportaments ansiosos en l'*Open Field Test* (E), el nivell d'interès i la motivació observable en el *Marble-burying Test* (F), les habilitats cognitives i la resposta a l'estrès que suposa el medi aquàtic avaluat amb els episodis de flotació durant l'execució del *Morris Water Maze Test* (G) i la valoració dels l'activitat motora associada al ritme circadià durant 84 hores (H) varen ser analitzats en sis $PDK1^{-/-}Cre^{-}$ (WT, representat en les gràfiques en forma de barres i punts negres) i sis $PDK1^{-/-}Cre^{+}$ (L155E, representat en les gràfiques en forma de barres i punts blancs) ratolins de sexe femení.

DISCUSSIÓ

La via de la PI3K/PKB es troba implicada en múltiples respostes cel·lulars i la seva desregulació comporta l'aparició de diverses malalties. El descobriment de PDK1 com la quinasa responsable de la fosforilació i activació de PKB i d'altres membres de la família de les AGC quinases, va realçar i centralitzar l'interès en el paper que PDK1 jugava en les respostes atribuïdes a la via de la PI3K/PKB.

Aquest paper central de la màster quinasa va ser reafirmat amb la letalitat embrionària tant del ratolí *knockout* de PDK1 com dels ratolins *knockin* en dos dominis de la quinasa i que permeten l'activació diferencial de PKB respecte la resta de membres de la família de les AGC quinases: el domini PH i el domini PIF-pocket. Per superar aquests defectes en el desenvolupament que resulten letals en el període embrionari, es va optar per estratègies de mutagènesi dirigida on es substituïa la lisina 465 per un àcid glutàmic en el PH-domain de PDK1; i d'altra banda, es dirigia l'expressió de la mutació PDK1 L155E al sistema nerviós central gràcies a l'estratègia del *minigene*. D'aquesta manera es varen obtenir ratolins viables amb un o l'altre domini funcional de PDK1 inhabilitat, que van permetre la dissecció de la via de la PI3K i de les respostes associades als substrats activables diferencialment per PDK1, *in vivo* i en teixits diferenciats.

L'estratègia del *minigene* permet la generació de ratolins que expressen diferents nivells de proteïna mutant de PDK1

Els ratolins *knockin* condicional que expressen la mutació L155E de PDK1 a sistema nerviós central, eren viables i fèrtils; però tot i superar el desenvolupament embrionari, els ratolins PDK1^{-/-} Cre⁺ presentaven una freqüència mendeliana de naixement significativament inferior als genotips PDK1^{+/-} Cre⁺, PDK1^{+/-} Cre⁻ i fins i tot als PDK1^{-/-} Cre⁻. La reduïda quantitat de proteïna PDK1 dels ratolins d'aquest últim genotip era suficient per preservar el correcte desenvolupament embrionari i el naixement a freqüències mendelianes similars als ratolins control d'una forma similar al què ocorria amb els ratolins hipomorfs pel gen de PDK1 (Lawlor et al., 2002). Aquesta alteració en la distribució genotípica de naixements no es reproduïa en el model murí que dirigia la mutació a múscul esquelètic sota el promotor Mck, la qual cosa

ens portaria a pensar en un efecte dependent de teixit i que s'associaria a l'expressió de la proteïna mutant (Bayascas et al., 2006). Això podria implicar que els defectes musculars associats a la mutació L155E de PDK1 durant el desenvolupament no són tant limitants com els neuronals per la viabilitat embrionària. D'altra banda, tant els ratolins PDK1^{-/-} Cre⁻ com els PDK1^{-/-} Cre⁺ eren viables després del naixement, fèrtils i compartien una reducció del 20% en el pes corporal (Fig.80A). Aquesta reducció del 20% en el pes podria associar-se a l'expressió de més del 50% de la proteïna mutant en teixits on no s'expressa la Cre-Recombinasa, que resultaria del *leaking* inherent a l'estratègia del *minigene*. Aquest escenari comporta una reducció en la mida i el nombre de cèl·lules al sistema nerviós central que condueix a una reducció del volum cerebral (Fig.61). D'altra banda, descartaríem una reducció del pes causada per la penetrància de la mutació en les vies neuronals hipotalàmiques que provoqués una reducció en la ingesta del ratolí, ja que aquesta està preservada (Fig.80A).

La substitució de la leucina 155 per un àcid glutàmic impedeix estèricament la interacció del PIF-pocket de PDK1 amb el motiu hidrofòbic dels seus substrats. Tot i que la mutació no compromet els nivells d'expressió i activitat catalítica de la quinasa, PDK1 és incapaç de reconèixer i activar els substrats que depenen d'aquest domini (Fig.57C) (Collins et al., 2003).

Teòricament, l'expressió de la proteïna PDK1 L155E s'havia de limitar en els teixits neuronals on, sota el promotor neuronal de la nestina, s'expressés la Cre-Recombinasa. A la pràctica, observem que la seqüència de terminació de la transcripció del *minigene* no és prou forta per evitar l'expressió gènica i la síntesis de la proteïna mutant de PDK1 en els teixits on no s'expressa la Cre-Recombinasa, fet que amb els creuaments adequats ens permet generar unes sèries al·lèliques de quantitats creixents de la proteïna mutant de PDK1 (Fig.57C). Aquesta situació ja s'havia caracteritzat en el model murí on la mutació del PIF-pocket de PDK1 es dirigia a múscul esquelètic sota el promotor de la Mck. En aquest model, es va obtenir per RT-PCR la mateixa proporció de seqüències PDK1 L155E que PDK1 WT a partir d'RNA procedent de teixit cardíac de ratolins PDK1^{-/-} Cre⁻ (Bayascas et al., 2006).

La penetrància d'aquest *leaking*, que implica la síntesis de la proteïna mutant de PDK1 en fins a sis regions cerebrals diferents de ratolins adults PDK1^{-/-} Cre⁻ a nivells comparables als detectats en ratolins PDK1^{-/-} Cre⁺, ens va portar a la hipòtesis que aquest fet podia ser degut a la inestabilitat genòmica de les neurones postmitòtiques, ja que no es reproduïa en mostres obtingudes de cervells embrionaris ni en altres teixits adults. Alguns casos d'inestabilitat genòmica es donen tant en persones com en models murins de *Huntington*, on la variació del nombre de repeticions CAG del gen de la hungtintina genera un mosaicisme associat a múltiples factors, entre ells l'edat, i que és també dependent del teixit analitzat (Gonitel et al., 2008). Aquesta hipòtesis es descartava en observar una amplificació diferencial, a partir d'extractes d'ADN procedents de teixits neuronals i no neuronals de ratolins adults i d'embrions PDK1^{-/-} Cre⁻ i PDK1^{-/-} Cre⁺, de la seqüència genòmica corresponent a la regió de l'exó 4, on es troba la mutació PDK1 L155E i que indica que el *cassette* del *minigene* és delecionat en els teixits PDK1^{-/-} Cre⁺ però no en els PDK1^{-/-} Cre⁻ (Fig.59). Aquest resultat ens deixa oberta la possibilitat que la maquinària neuronal de processament de l'ARN ens exclogués el *minigene* del missatger madur, fent així que un homozigot que no expressés la Cre-Recombinasa esdevingués mutant. En altres estudis on, per superar els problemes que comporten els models de sobreexpressió proteica, també s'ha apostat per estratègies de *knockin* condicional basades en dirigir l'expressió d'una proteïna modificada a un teixit particular, s'ha observat que la senyal de finalització de la transcripció utilitzada no ha estat tampoc suficient forta com per evitar la transcripció de l'al·lel condicional i es generava un pre-mRNA que contenia l'últim exó duplicat (Fortin et al., 2014). Aquesta situació comporta un conflicte per la maquinària d'*splicing* cel·lular de preferència d'un exó respecte un l'altre, que en el nostre model resulta en un augment de la proteïna mutant expressada. Aquesta peculiaritat es podria intentar solucionar introduint una seqüència més forta de finalització de la transcripció, o si no és possible, introduint una seqüència que fos diana per endoribonucleases cel·lulars que comportés la degradació del fragment de pre-mRNA que conté l'exó duplicat, per evitar que fos diana de la maquinària d'*splicing* cel·lular.

La inhabilitació del PIF-pocket de PDK1 a neurones impedeix l'activació de S6K, RSK i SGK, però no de PKB

PDK1 i PKB pertanyen a una gran família gènica anomenada la família de les AGC quinases. Totes elles comparteixen un alta homologia estructural i un mateix mecanisme d'activació per fosforilació en dues regions altament conservades: el *T-loop* i el motiu hidrofòbic (Manning et al., 2002; Pearce et al., 2010). En presència d'un estímul tròfic, la PI3K catalitza la conversió de PIP2 a PIP3, i en increments d'aquest segon missatger es dona una col·localització de PDK1 i PKB a la membrana, ja que ambdues presenten el domini PH d'interacció a PIP3. Això permet l'activació de PKB a través de la fosforilació de la treonina 308 per PDK1 i de la serina 473 per mTORC2 (Alessi et al., 1997; Bayascas and Alessi, 2005). A l'hora d'analitzar els nivell basals de fosforilació de PKB tant en teixits neuronals de ratolins adults com en cultius primaris de neurones corticals estimulats agudament amb BDNF, vàrem poder comprovar que la inhabilitació del PIF-pocket de PDK1 no comprometia aquests llocs de fosforilació ni l'activació de PKB monitoritzada a través de la fosforilació de substrats canònics d'aquesta quinasa com PRAS40, FoxO, GSK3 o TSC2 (Fig.60/62A). En canvi, en inhabilitar el PH-domain de PDK1 en neurones corticals PDK1^{K465E/K465E} sí que es reduïa la fosforilació en la treonina 308 de PKB per PDK1, però només podia ser eliminada totalment inhibint mTORC2. Això ens indica que l'activació de PKB dependent del PH-domain de PDK1 respon a l'execució d'una resposta ràpida davant d'un estímul agut, com ara una neurotrofina o la despolarització postsinàptica puntual que implicaria una entrada de Ca²⁺; però en absència d'aquest mecanisme, PDK1 és encara capaç de reconèixer el motiu hidrofòbic fosforilat en la serina 473 per part d' mTORC2, i contribuir així a l'activació de PKB per fosforilació de la treonina 308 al *T-loop* de la quinasa (Najafov et al., 2012; Zhou et al., 2014).

La resta de membres de la família de les AGC quinases, al no presentar PH-domain, requereixen de la prèvia fosforilació en el seu motiu hidrofòbic, la qual cosa genera un *docking site* que PDK1 reconeix a través del seu domini PIF-pocket, permetent-li fosforilar el T-loop del substrat i activar-lo. Si s'inhabilita aquest domini de PDK1 disminueix, d'una forma genotip dependent, la

fosforilació en els llocs d'activació tant de la S6K com de RSK, fins a desaparèixer totalment en llisats procedents de cervells adults i, de la mateixa manera, en cultius primaris de neurones corticals de ratolins PDK1^{-/-} Cre⁺. Aquesta disminució s'acusa més, fins a desaparèixer totalment, en cultius primaris de neurones corticals PDK1^{-/-} Cre⁺ estimulats agudament amb BDNF. El mateix escenari es reproduïx en la fosforilació dels motius hidrofòbics de les respectives quinases (Fig.62). Una possible explicació a aquest fenomen podria ser que en absència de fosforilació del *T-loop*, el motiu hidrofòbic fosforilat dels substrats de PDK1 no pogués interaccionar amb la butxaca hidrofòbica de la pròpia quinasa per assolir la conformació activa, fet que deixaria accessible el grup fosfat del motiu hidrofòbic a l'acció de les fosfatases (Hauge et al., 2007). De la mateixa manera, la inhabilitació de la butxaca que reconeix el grup fosfat dins del motiu hidrofòbic dels substrats de PDK1, també comporta una reducció en la fosforilació d'ambdós llocs d'activació de les quinases dependents d'aquest domini de PDK1 (Collins et al., 2005).

L'impacte bioquímic resultat de la mutació del PIF-pocket de PDK1 no té conseqüències en les respostes de supervivència neuronal dependents de BDNF

Sorprenentment, l'incapacitat de PDK1 d'activar les quinases dependents del PIF-pocket no té conseqüències significatives en la supervivència neuronal (Fig.63). Tot i això, s'observa una tendència a la baixa en la viabilitat de les neurones corticals en cultiu procedents dels embrions PDK1^{-/-} Cre⁻ i PDK1^{-/-} Cre⁺, i que es veu acompanyada d'una reducció en el nombre de neurones del còrtex embrionari (Fig.61A). Si tenim en compte que l'activació de PKB no resulta afectada, PKB esdevindria la quinasa responsable de les respostes de supervivència, tot antagonitzant el programa de mort cel·lular (Datta et al., 1999). L'argumentació anterior seria suficient si no s'hagués demostrat que en neurones corticals procedents de ratolins PDK1^{K465E/K465E}, que presenten el PH-domain de la quinasa inhabilitat i una reducció en l'activació de PKB, tampoc no es mostrava una alteració de la viabilitat respecte les neurones control (Zurashvili et al., 2013).

Sinèrgia funcional de les quinases regulables per mTORC2, PKB i SGK, en les respostes de viabilitat neuronal

En l'intent de trobar la quinasa responsable de la viabilitat neuronal, vàrem confirmar la implicació de la PI3K, PDK1 i PKB en promoure la supervivència cel·lular a partir de la inhibició farmacològica d'aquestes. Aquest fet, descrit en la literatura, no era tan rellevant com comprovar que la inhibició específica d'mTORC2 en neurones corticals reduïa la viabilitat d'aquestes a nivells equivalents als obtinguts en inhibir les quinases descrites anteriorment (Fig.65).

mTORC2 s'encarrega de la fosforilació en el motiu hidrofòbic de diverses isoformes de PKC, de PKB i de SGK generant un *docking site* per PDK1 que permetrà al mecanisme PIF-pocket de PDK1, l'activació d'aquestes quinases (Bayascas, 2010). Recentment s'ha descrit que la inhibició d'mTORC2 en neurones PDK1^{K465E/K465E} impedeix significativament el rescat de la viabilitat neuronal intercedida pel BDNF, i s'associa a una reducció en la fosforilació dels llocs d'activació de substrats de PKB com PRAS40, TSC2, GSK3 i FoxO (Zhou et al., 2014). La regulació d'alguns substrats de PKB, com poden ser FoxO i NDRG1, és compartida amb SGK (Pearce et al., 2010). NDRG1 es troba regulada per SGK en condicions basals, com es pot demostrar en la reducció de la fosforilació del substrat de SGK en les neurones mutants PDK1^{L155E/L155E}, que és rescatada al estimular-les amb BDNF (Fig.62B). Contràriament, la fosforilació d'NDRG1 induïda per BDNF resulta minvada en neurones PDK1^{K465E/K465E}, la qual cosa ens va portar a concloure que en aquestes condicions PKB seria la responsable de la fosforilació d'NDRG1 (Zurashvili et al., 2013).

La sinèrgia de funcions entre PKB i SGK descrita en els fets anteriors ens va conduir a hipotetitzar una redundància d'ambdues quinases en el control de la viabilitat neuronal. Això explicaria que en neurones corticals procedents dels dos models murins on s'inhabilitaven específicament els dos dominis funcionals de PDK1, impedint la corresponent activació de PKB i SGK, no resultés alterada la supervivència neuronal.

Per validar la hipòtesi plantejada, vàrem inhibir farmacològicament SGK amb dosis creixents de l'inhibidor, en absència o presència de l'inhibidor de PKB. Per una banda, la inhibició de la SGK resulta en una reducció en la fosforilació d'ULK, FoxO i NDRG1; mentre que la inhibició de PKB redunda en la reducció de la fosforilació d'NDRG1, a la vegada que implica la reducció esperada en els nivells de fosforilació dels seus substrats canònics: TSC2 i PRAS40. La reducció de la fosforilació d'NDRG1 és progressiva en augmentar la concentració de l'inhibidor de SGK; mentre que si aquesta inhibició la combinem amb la de PKB, la fosforilació d'NDRG1 disminueix, però deixa de ser dependent de la dosi d'inhibidor d'SGK fins a concentracions, de 10 μ M, que ja resultarien inespecífiques (Fig.67). La majoria dels inhibidors utilitzats, a excepció del de PKB, són inhibidors ATP competitiu, i el fet que el lloc d'unió a ATP es trobi molt conservat en les diferents quinases, comporta que elevades concentracions de l'inhibidor arribin a inhibir altres quinases que comparteixin homologia estructural, resultant en respostes cel·lulars inespecífiques que no poden ser atribuïdes a quinases individuals. Un clar exemple n'és l'inhibidor de PDK1, on a concentracions de 10 μ M no només evita el rescat per BDNF en neurones corticals, sinó que condueix a una mort cel·lular exacerbada probablement com a conseqüència d'inhibir altres quinases implicades també en la supervivència neuronal (Fig.64). El fet que l'inhibidor de SGK, però no el de PKB, sigui ATP competitiu i comporti una inhibició de la quinasa dependent de la concentració, ens porta a pensar en dues opcions. La primera es basaria en què l'activació d'NDRG1 davant d'un estímul tròfic depèn de SGK i PKB, i per això un cop inhibida PKB al·lostèricament, disminueix la fosforilació d'NDRG1 d'una forma proporcional a la dosi d'inhibidor de SGK. L'altra respondria al fet que PKB i SGK comparteixen una elevada homologia estructural i a partir de 0.5 μ M d'inhibidor de SGK, aquest comencés a ser inespecífic i inhibís també PKB.

D'altra banda, aquest escenari no seria el mateix per l'altre substrat comú de les dues quinases, FoxO. En aquest cas, es dona una reducció en la seva fosforilació al inhibir SGK a partir de 0.5 μ M d'inhibidor, sense agreujar-se per la inhibició de PKB. Tenint en compte que una activitat reduïda de PKB, ja sigui per una inhibició al·lostèrica o bé per un defecte en la seva activació en

neurons corticals procedents de ratolins $PDK1^{K465E/K465E}$, no comporta una alteració dels nivells de fosforilació de FoxO davant d'un estímul tròfic (Zurashvili et al., 2013), això ens porta a pensar que la regulació d'aquest substrat, en aquesta situació, es troba en mans de SGK. Aquesta proposta es referma quan observem en cultius primaris de neurons corticals procedents de ratolins $PDK1^{-/-} Cre^{-}$ i $PDK1^{-/-} Cre^{+}$, una reducció en la fosforilació de FoxO respecte les neurons control (Fig.62A).

La inhibició de SGK impedeix l'efecte neuroprotector del BDNF en neurons corticals deprivades tròficament, traduïnt-se en una reducció de la viabilitat neuronal de forma dependent a la dosi de l'inhibidor, la qual que es veu significativament agreujada si s'inhibeix alhora PKB. La inhibició de SGK comporta una reducció de la viabilitat neuronal fins a dosis de $0.5 \mu M$; a partir d'aquesta dosi observem una reducció de la fosforilació de FoxO que ens portaria a determinar aquesta dosi com la òptima i específica d'inhibició de la quinasa. D'altra banda, al inhibir ambdues quinases es dona una caiguda de la viabilitat neuronal major a la que es dona amb la inhibició aïllada de SGK, escenari que es reproduïx exactament en els patrons de fosforilació d'NDRG1 (Fig.68).

La discussió anterior ens portaria a pensar que tant FoxO com NDRG1 es troben implicats en les funcions neuroprotectores del BDNF d'una forma SGK i PKB específicament dependent. A més a més, al inhibir SGK a partir de $0.5 \mu M$ alhora que PKB, resulta en una depleció de l'efecte neuroprotector del BDNF i una inducció de l'apoptosi neuronal associada a una reducció de la fosforilació de FoxO i d'NDRG1. Com que aquesta situació no es dona en absència de l'inhibidor de PKB, això ens condueix a contemplar la possibilitat que NDRG1 fos el substrat comú de SGK i de PKB que regularia la supervivència de les neurons corticals.

L'activació de S6K per part de PDK1 regula la polarització, diferenciació i sinaptogènesi durant el desenvolupament neuronal

Les diferents PI3K de classe I s'expressen àmpliament en el sistema nerviós central ja sigui durant el desenvolupament o en el cervell d'organismes adults

(Cosker and Eickholt, 2007). L'activació de la PI3K està associada a la morfogènesi neuronal, participant en els processos de polarització i diferenciació neuronal. Així, es demostra una acumulació de PIP3 en els processos neuronals que esdevindran neurites o axons, mentre que l'augment de l'elongació axonal està associat a la inhibició de la fosfatasa d'aquest segon missatger, PTEN (Ménager et al., 2004; Arevalo and Rodriguez-Tebar, 2006). PIP3 s'involucra en la desestabilització del citoesquelet a través de la inhibició de RhoA i l'estabilització dels microtúbuls gràcies a la inhibició de GSK3 per part de PKB (Yoshimura et al., 2006). D'altra banda, el fet que es descobrís que l'activació permanent de GSK3 no comportava un defecte a nivell de desenvolupament, però sí que ho feia la sobreexpressió de TSC2, un altre substrat de PKB, que evitava la formació d'axons, va permetre traçar la via PI3K/PKB/TSC2/mTORC1 com a responsable de la polarització neuronal (Gärtner et al., 2006; Choi et al., 2008). Aquests resultats es demostraven en els ratolins que expressaven la proteïna PDK1^{K465E/K465E}, que presentaven una disminució de la longitud de l'axó durant el desenvolupament respecte les neurones control causada per una reducció en l'activació de PKB i en la fosforilació de TSC2 i de PRAS40, però no de GSK3 (Zurashvili et al., 2013). Aquest defecte es trobava associat a una sobreinhibició per part de TSC2 i PRAS40 sobre mTORC1, la qual comporta una reducció en l'expressió de les BRSK, que resulten indispensables en la regulació de la polarització dels microtúbuls i la conseqüent elongació axonal (Ebner et al., 1999; Kishi et al., 2005; Wildonger et al., 2008).

D'altra banda, la inhabilitació del PIF-pocket de PDK1 en neurones corticals es tradueix en una reducció en la fosforilació de quinases dependents d'aquest domini, com la S6K i RSK, sense alterar la fosforilació de PKB i els seus substrats PRAS40 i TSC2. Tot i mostrar afectada la ruta bioquímica complementària, dins la via de la PI3K/PDK1, a la que presentaven els ratolins PDK1^{K465E/K465E}; les neurones corticals procedents d'embrions PDK1^{-/-} Cre⁺ també desenvolupaven defectes en la polarització neuronal i una reducció de la longitud axonal (Fig.69/Fig.70). Ambdós models presentaven una deficiència en els nivells de fosforilació de S6K i el seu substrat S6; en els ratolins PDK1^{K465E/K465E} aquesta deficiència era deguda a una reducció en l'activitat de

PKB i la consegüent inhibició d'mTORC1 (Zurashvili et al., 2013) i en els ratolins $PDK1^{-/-} Cre^{+}$, per la impossibilitat per part de PDK1 de reconèixer el motiu hidrofòbic fosforilat de la quinasa, el què impedia la consegüent activació per fosforilació en el seu *T-loop* (Balendran et al., 2000; Bayascas, 2010). Així, els resultats obtinguts en aquest treball apuntaven a què la disfunció d'aquests processos dins del desenvolupament neuronal podrien respondre, en ambdós models murins, a una reducció de l'activació de la S6K i els seu substrat S6.

Per acabar de confirmar aquesta hipòtesi, vàrem tractar cultius primaris de neurones corticals en dues etapes representatives del desenvolupament neuronal amb diferents inhibidors de les quinases de la via de la PI3K. Els inhibidors de la SGK i de RSK no comportaven una alteració d'aquests processos neuronals, mentre que l'inhibidor d'mTORC2 semblava arrestar la neurona en l'etapa primària del desenvolupament, caracteritzat per la presència de la lamelipòdia (Fig.72A). El component d'mTORC2 Rictor s'ha vist que preserva l'activació de les RhoGTPases Rac1 i Cdc42 inhibint RhoGDI2, ambdues indispensables per la polarització i diferenciació neuronal (Agarwal et al., 2013). Això i el fet que s'utilitzen inhibidors d'mTORC2 per evitar els processos de migració i la consegüent metàstasi en el càncer de còlon (Gulhati et al., 2011) ens condueix a proposar, per primer cop, el paper d'aquest complex durant el desenvolupament neuronal, possiblement associat a la migració *in vivo* de les neurones.

La inhibició apical de la via amb l'inhibidor de la PI3K i de PDK1 comportava una reducció de la longitud axonal i la polarització neuronal. Aquesta alteració es reproduïa al inhibir la S6K i de forma proporcional al incrementar la dosi de l'inhibidor, fet que correlacionava amb una reducció en la fosforilació del substrat S6 (Fig.72B). Aquesta inhibició comportava una reducció de l'axó, la pèrdua de les neurites i la consegüent condensació del nucli; fet que reafirmava el paper específic, demostrat en altres estudis, de la S6K vers altres substrats d'mTORC1 en la diferenciació de les neurones glutamatèrgiques (Chuang et al., 2013). Aquesta relació entre la S6K i la diferenciació neuronal ens va portar a pensar que no fos degut al paper que desenvolupa en la formació del PIC i la traducció de proteïnes indispensables en els processos descrits anteriorment.

Entre aquestes proteïnes trobem la BRSK, on la seva expressió i activació, depenent de LKB1, no és veu afectada en embrions $PDK1^{-/-} Cre^{+}$, a diferència del què passa en embrions $PDK1^{K465E/K465E}$, que acaben però recuperant els nivells d'expressió de BRSK en adults (Fig.71). (Wildonger et al., 2008; Magnuson et al., 2012). Aquesta recuperació explicaria l'absència d'una alteració en les capes del còrtex de ratolins $PDK1^{K465E/K465E}$ adults, ja que l'expressió de les BRSK controla la neurita que es diferenciarà a axó mitjançant l'estabilització dels microtúbuls a través de la regulació de les proteïnes Tau i Map2 (Ebner et al., 1999; Kishi et al., 2005; Ruiz Babot, 2013).

Aquest fet ens genera força controvèrsia, però es podria explicar per una regulació diferencial en l'expressió de diverses proteïnes associada a diferents mecanismes de traducció. La traducció proteica més coneguda es basa en la formació del complex PIC, que es troba regulat per 4EBP1, S6K i RSK, i la consegüent traducció d'mRNAs d'una forma dependent de la seva seqüència d'oligopirimidines presents en els seu extrem 5'CAP (Shahbazian et al., 2006; Magnuson et al., 2012). Aquest mecanisme de traducció proteica es troba altament associat amb el complex d'mTORC1, i per això s'ha vist que la resistència que presentaven molts càncers tractats amb rapàlegs resultés de mantenir una síntesi proteica independent a la traducció 5'CAP dels mRNAs i associada a increments de la proteïna de la via de la MAPK, Mnk1 (Walsh and Mohr, 2014). Aquest escenari podria reproduir-se en les neurones corticals que presenten la mutació en el PH-domain de PDK1, i explicaria el mecanisme compensatori per la recuperació dels nivells d'expressió de BRSK en adult. En les neurones corticals procedents d'embrions $PDK1^{-/-} Cre^{+}$, que tampoc podrien dependre de la S6K ni de RSK per la síntesi de proteïnes 5'CAP dependent, es repetiria l'escenari anterior; o bé que alguna de les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1 jugués un paper important en la traducció regulant els 3'UTR del mRNAs, com passa en alguns virus, o en la regulació de ribonucleoproteïnes que reprimeixen l'expressió de mRNAs (Jung et al., 2014; Das Sharma et al., 2015). Aquest últim cas es dona en la traducció d'mRNAs com el del BDNF i de Tau, proteïnes indispensables en els processos de desenvolupament neuronal (Allen et al., 2013; Moschner et al., 2014).

La inhibició de la S6K d'una forma dosis dependent, que es reproduïx en inhibir la PI3K i PDK1, però no en inhibir la SGK, comporta una reducció dels nivells d'expressió del marcador postsinàptic PSD-95 i del marcador presinàptic sinaptofisina, proposant una possible alteració de la formació i consolidació de la sinapsi. Aquesta alteració afectaria tant les neurones glutamatèrgiques com les gabaèrgiques, tal i com es dedueix de la reducció en l'expressió del marcador d'interneurones GAD67 associat a la inhibició de la S6K (Fig.73). La S6K també participa a nivell presinàptic en l'alliberació de neurotransmissors, fet que podria explicar els nivells reduïts de sinaptofisina, proteïna que es troba implicada en el mecanisme d'alliberació de les vesícules presinàptiques davant d'una despolarització intercedida per Ca^{2+} (Cheng et al., 2011a). D'altra banda, la S6K respon a fenòmens de LTP amb la síntesi de 5'CAP mRNAs a nivell postsinàptic. Alguns d'aquests mRNAs codifiquen per proteïnes amb dominis PDZ com la PSD95 i per això, una reducció en l'expressió d'aquestes evitaria l'estabilització dels receptors d'AMPA i NMDA i la conseqüent habilitació funcional de l'espina (Kim and Sheng, 2004; Tsokas et al., 2005, 2007).

Els defectes en el desenvolupament neuronal es tradueixen en desordres en les capes corticals i en les poblacions neuronals que les conformen

Els defectes en el desenvolupament de les neurones corticals associats a desregulacions en l'eix PI3K/PKB/mTORC1 no suposen alteracions fisiològiques visibles en el cervell de ratolins adults $PDK1^{K465E/K465E}$ (Zurashvili et al., 2013). En canvi, els defectes en el desenvolupament associats als dèficits en l'activació de les quinases dependents del PIF-pocket de PDK1 comporten una reducció de la densitat de fibres axonals en diferents regions cerebrals, com són el còrtex somatosensorial, i en les àrees del CA1 i del gir dentat de l'hipocamp (Fig.74). Aquestes alteracions no són causades per una reducció en el nombre de neurones, la qual cosa no és d'estranyar tenint en compte els resultats obtinguts a nivell de supervivència i la sinèrgia funcional de PKB i SGK en aquesta resposta cel·lular (Fig.75). La reducció en la mida de les neurones hipocampals és presumptament deguda als dèficits d'activació de la S6K, ja que controla la mida i el volum cel·lular (Fig.76) (Shima et al., 1998). D'altra banda, les diferències fisiològiques observades als cervells adults dels

dos models murins de PDK1 podrien respondre al fet que els defectes a nivell de desenvolupament en ratolins PDK1^{K465E/K465E} es veuen compensats en recuperar els nivells d'expressió de les BRSK, la qual cosa no es deu donar amb l'expressió de les proteïnes implicades en el desenvolupament que es troben afectades en els ratolins PDK1^{-/-} Cre⁺. Entre aquestes diferències observem una compactació de les neurones piramidals en les capes superiors del còrtex somatosensorial de ratolins adults PDK1^{-/-} Cre⁺, concretament la capa IV, alhora que es dona una exclusió en aquesta capa de les subpoblacions d'interneurones parvoalbúmina positives (Fig.77). L'escenari de les neurones glutamatèrgiques es reproduïx en ratolins *knockout* pel gen nuclear distribution factor E (Nde1), comportant microcefàlia i defectes migratoris en les capes més superficials del còrtex (Feng and Walsh, 2004; Sasaki et al., 2005). Nde1 i el seu ortòleg en mamífers Ndel1 es troben íntimament lligats als microtúbuls, promovent la seva estabilització i elongació, ja sigui de forma directa o interaccionant amb proteïnes motores com les dineïnes, a fi de transportar les proteïnes Lis1 i Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1), que a través de la inhibició de GSK3 promouen els processos de diferenciació axonal (Okamoto et al., 2015). D'altra banda, la deslocalització de les interneurones parvoalbúmina positives es podria explicar per una alteració de les proteïnes implicades en la dinàmica dels filaments d'actina associat als defectes en la polarització i diferenciació neuronal observats en cultius primaris de neurones corticals PDK1^{-/-} Cre⁺, que reproduïx un escenari semblant al dels *knockout* de Rac1 i Rac3, que comporta defectes en la migració de les interneurones tant en l'hipocamp com en el còrtex (Schwamborn and Püschel, 2004; Chen et al., 2007; Vaghi et al., 2014). La disposició de les neurones piramidals i les interneurones indiquen possibles defectes en el procés de migració d'aquestes, ja sigui de forma diferencial al llarg del desenvolupament embrionari, o degut a una alteració en el procés de migració radial comú entre les dues poblacions neuronals després del naixement (Bartolini et al., 2013). Per confirmar aquesta hipòtesi s'hauria de marcar amb bromodesoxiuridina (BrdU) els embrions a diferents estadis del desenvolupament per veure la migració i formació de les diferents capes corticals; i en el cas de les interneurones gabaèrgiques, es podria comprovar si la migració resulta alterada

com a conseqüència d'una alteració en la bastida axonal, indispensable per la migració tangencial de les interneurons que conformen les projeccions corticotalàmiques. Aquestes projeccions es caracteritzen per expressar proteïnes d'adhesió cel·lular com L1, TAG-1 i neural cell adhesion molecule (NCAM) que són indispensables per la seva formació (Denaxa et al., 2001; Marín et al., 2002; Espinosa et al., 2009; Enriquez-Barreto et al., 2012). De la mateix manera, l'absència d'expressió de proteïnes implicades en la polarització axonal com LKB1, procés que també es troba afectat en neurones que expressen la mutació del PIF-pocket de PDK1, comporten pèrdues d'aquest eix corticotalàmic (Barnes et al., 2007).

La mutació en el PIF-pocket de PDK1 no només compromet la localització de les subpoblacions d'interneurons positives pel marcador de la parvalbúmina, sinó que també provoca una reducció dels nivells de GAD67 en les capes superficials de diferents regions del còrtex, com són el somatosensorial i el cingulat (Fig.78/Fig.79). La reducció en l'expressió de GAD67 es trobaria associada a la inhabilitació de la via PI3K/PDK1/mTORC1/S6K, ja que es reproduïx aquesta disminució en els nivells de GAD67 en inhibir a diferents dosis la S6K de cultius de neurones corticals madurs (Fig.73). GAD67 és un enzim específic de les interneurons gabaèrgiques que catalitza la conversió del glutamat a GABA, neurotransmissor inhibidor de les neurones piramidals. Aquesta alteració podria ser una conseqüència dels defectes migratoris, ja sigui de les neurones piramidals o de les interneurons, com varen poder comprovar en realitzar el *knockout* de TSC1 amb la conseqüent afectació de l'eix PI3K/PDK1/mTORC1/S6K en cèl·lules progenitores d'interneurons (Fu et al., 2012). Indiferentment de quin sigui l'escenari, és segur que una alteració de la localització i la conseqüent activitat de les interneurons gabaèrgiques arriba a comportar un trencament de la comunicació amb les neurones piramidals que es tradueix en una disminució de les ones gamma cerebrals (Akbarian and Huang, 2006; Sohal et al., 2009; Volman et al., 2011).

Conductes bizarres pròximes a alguns trastorns psiquiàtrics en ratolins PDK1^{-/-} Cre⁺

L'escenari fenotípic que presenta el model murí que expressa la proteïna PDK1 amb el PIF-pocket mutat a sistema nerviós central, és reproduïble en diferents malalties psiquiàtriques com la depressió major, l'ASD, l'epilèpsia o l'esquizofrenia. Entre els diferents perfils de pacients que presenten esquizofrènia s'ha comprovat que presentaven nivells reduïts de GAD67 en les capes del còrtex més superficials, sobretot a l'àrea equivalent al còrtex cingulat de ratolí en humans, el còrtex prefrontal (Lewis et al., 2005; Curley and Lewis, 2012). També solen presentar mutacions o alterada l'activitat de diferents proteïnes implicades en l'estabilització dels microtúbuls, fet associat als processos de diferenciació neuronal i sinaptogènesi, i on la seva desregulació impedeix la migració d'aquestes poblacions tant representativa dels casos d'esquizofrènia (Tomita et al., 2011; Glausier and Lewis, 2013). Entre aquestes proteïnes trobem DISC1, NRG1, Erb3/4, Nde1 i GSK3 (Emamian et al., 2004; Harrison and Weinberger, 2005; Fazzari et al., 2010; Kimura et al., 2015; Okamoto et al., 2015), les quals es troben sota el control de la via de la PI3K/PKB (Zheng et al., 2012).

La semblança dels resultats obtinguts en mostres de pacients que presentaven la malaltia respecte el nostre model de ratolí, ens va portar a analitzar si aquests defectes neuroquímics es traslladaven també en desordres cognitius i de conducta. Per això als diferents ratolins se'ls va aplicar una bateria genèrica de tests per valorar globalment si presentaven algun trastorn de comportament. Aquesta bateria d'experiments conductuals seguia els procediments SHIRPA que es basen en 3 estadis d'experiments, on els dos primers permeten una avaluació fenotípica genèrica del ratolí i en el tercer s'executen experiments conductuals més concrets per obtenir una informació més detallada i respondre qüestions, per exemple, associades a alteracions de la memòria i aprenentatge o ansietat (Rogers et al., 1997). Els diferents tests convergien en què els ratolins PDK1^{-/-} Cre⁺ presentaven una reducció en l'activitat exploratòria i una falta de motivació per realitzar els diferents experiments conductuals, que es traslladava en paràlisi en l'experiment de l'Open Field i en flotació en el del

Morris Water Maze (Fig.80). Aquest últim experiment, al ser una prova que genera estrès, ens mostrava que aquest ratolins presentaven una hipersensibilitat davant d'aquest estímul, observable amb els resultats de flotació; alhora que permetia evidenciar un dèficit tant en la memòria a curt com a llarg plaç. D'altra banda, malgrat presentar conductes bizarres davant de l'estímul de les diverses proves conductuals, que entenem com a moviments repetits sense significat aparent que no es reproduïen en el ratolins control, no s'observaven conductes aversives o dèficits en la socialització dels ratolins mutants respecte el control quan es trobaven a les seves gàbies. Les dades conductuals sobre la sensibilitat de les neurones glutamatèrgiques les podríem acabar de corroborar fisiològicament mesurant la senyal despolaritzant de Ca^{2+} en cultius de neurones corticals procedents dels corresponents genotips, i en el cas que estigués afectada analitzaríem, en cultius organotípics, si es reproduïen els processos de long term potentiation (LTP) i long term depression (LTD) responant als corresponents estímuls d'alta i baixa freqüència. Si en ambdós experiments trobéssim desajustos passaríem a comprovar que fossin deguts a una reducció del neurotransmissor GABA associat a la reducció de GAD67 observada en els nostres models, i per això efectuaríem una microdiàlisi de les regions histològicament alterades i quantificaríem per high-performance liquid chromatography (HPLC) els nivells del neurotransmissor.

Per validar-lo com a model d'esquizofrènia, hauríem de realitzar experiments conductuals més específics per aquesta malaltia, com el prepulse inhibition (PPI) per comprovar on es troba el llindar del *sensorimotor gating*. Aquest test consisteix en observar la capacitat inhibidora del sistema nerviós central davant d'un sobresalt o *startle* quan prèviament se l'havia exposat a un estímul de menor intensitat, a fi d'evitar una excés d'excitabilitat que comportaria la mort neuronal per excés de glutamat (Braff and Geyer, 1990). D'altra banda hauríem d'intentar forçar l'equilibri del *sensorimotor gating* a fi de comprovar el nivell de sensibilitat de les neurones glutamatèrgiques, induint la simptomatologia positiva de la malaltia, com un brot psicòtic, amb un agonista dels receptors d'NMDA com l'àcid kaínic o incrementant els nivells de dopamina amb amfetamina; i observar si es reverteix a nivells dels control tractant amb algun

neurofèptic específic del receptor de dopamina com l'haloperidol o una antipsicòtic atípic que inhibeixi de forma específica els receptors 5-HT_{2A} sense perjudicar els símptomes negatius i de memòria del ratolí (Beaulieu et al., 2009).

L'afectació de les interneurons gabaèrgiques i la consegüent sobreactivació de les vies neuronals glutamatèrgiques, ens va portar a pensar que obtindríem uns resultats conductuals propers als símptomes positius de l'esquizofrènia, com els brots psicòtics, que en ratolins es traslladarien en un augment de l'activitat locomotora dels ratolins PDK1^{-/-} Cre⁺ respecte als control, observables en les actimetries o en un augment del nombre de *rearings*.

Contràriament, ens trobem que el nostre model murí que expressa la mutació del PIF-pocket de PDK1 a sistema nerviós central, encaixaria més en un marc simptomàtic negatiu respecte els símptomes positius de la malaltia. Tenint en compte que un excés de glutamat és tòxic per les neurones i que la mutació s'expressa a nivell embrionari i per tant es troba sota paraigües de la plasticitat neuronal, ens fa pensar que podrien existir mecanismes compensatoris que substituirien les disfuncions de les interneurons gabaèrgiques. Un possible candidat podrien ser els astròcits, ja que modulen l'excitabilitat de les neurones glutamatèrgiques a través de reciclar el glutamat extracel·lular a través dels glutamat transporter-1 (GLT-1), on la seva absència provoca episodis epilèptics conduint a la mort del ratolí (Tanaka et al., 1997). A més a més, els astròcits presenten receptors i transportadors de GABA que els permeten la comunicació amb les interneurons; així com també alliberar aquest neurotransmissor a fi d'inhibir les neurones piramidals de les capes superiors dels còrtex prefrontal, on es troben les estructures anomenades *barrels*, corresponents a les regions histològicament afectades per la mutació del PIF-pocket de PDK1 i en els diferents models d'esquizofrènia (Benedetti et al., 2011; Meyer et al., 2011; Losi et al., 2014; Hanson et al., 2015).

Rellevància del model *knockin* de PDK1 a sistema nerviós central per la comunitat científica.

La majoria de tractaments per l'esquizofrenia es focalitzen a evitar els episodis psicòtics però tenen efectes negatius en la memòria i en l'atenció. Aquests es troben entre els símptomes negatius de l'esquizofrenia, els quals són poc estudiats i no hi ha fàrmacs efectius o específics per millorar aquesta altra cara de la malaltia. Per això únicament es continuen administrant antidepressius com els selectives serotonin reuptake inhibitor (SSRI) (Lewis and Moghaddam, 2006; Beaulieu et al., 2009). Això és degut en part a què la majoria de models murins que s'usen per estudiar la malaltia són models que emulen el símptomes positius o de psicosis però n'hi ha pocs que siguin validats com a models de símptomes negatius de l'esquizofrenia (Miyamoto and Nitta, 2014). El fet que la majoria de models de símptomes positius d'esquizofrenia, caracteritzats per l'hiperactivitat i la psicosis, es trobin associats a una reducció de l'activació de PKB i la seva capacitat d'inhibir GSK3 (Prickaerts et al., 2006; Ackermann et al., 2010), ens convida a pensar que els ratolins que expressen la mutació del PIF-pocket de PDK1 a sistema nerviós central podrien respondre a una simptomatologia negativa, caracteritzada per episodis depressius i amb dèficits cognitius, associada a la disfunció de les quinases dependents d'aquest domini de PDK1 i independent de PKB.

Aquest escenari ens permetria presentar el nostre model com un bon paradigma d'estudi tant de desordres en el desenvolupament neuronal com de conducta, a fi de comprendre millor el funcionament de diferents trastorns psiquiàtrics en humans com n'és el cas de l'esquizofrenia i poder desenvolupar fàrmacs més específics per pal·liar la simptomatologia de la malaltia.

CONCLUSIONS

- L'estratègia del *minigene* dirigeix l'expressió de la mutació L155E de PDK1 a sistema nerviós central. Aixó permet superar parcialment la letalitat embrionària del ratolí *knockin* total de PDK1, ja que els ratolins mutants mostren una reducció en la freqüència mendeliana durant el desenvolupament, i presenten microcefàlia associada a una reducció del volum i del nombre de neurones.
- Aquesta estratègia de transgènesi resulta en l'expressió de la proteïna mutant de PDK1 en ratolins PDK1^{-/-} Cre⁻, suposadament associada a processos relacionats amb la maduració de l'ARN missatger, la qual cosa permet la generació per creuaments genètics de sèries al·lèliques de quantitats creixents de proteïna mutant de PDK1.
- La inhabilitació del PIF-pocket de PDK1 evita el reconeixement del *docking site* dels seus substrats i la conseqüent fosforilació i activació de RSK, SGK i S6K, mentre que l'activació de PKB resulta inalterada.
- Les AGC quinases activables per mecanismes dependents del PIF-pocket de PDK1 no resulten indispensables per la supervivència i la viabilitat neuronal.
- PKB i SGK mostren una sinèrgia funcional en les respostes de supervivència i viabilitat neuronals que resideix en la regulació diferencial d'NDRG1 i FoxO.
- PDK1 promou la polarització i la diferenciació neuronal a través de l'eix mTORC1/S6K, però de forma independent a l'expressió de les BRSKs.
- Els defectes en el desenvolupament causats per la mutació L155E de PDK1 comporten molt possiblement una alteració en la migració de les diferents poblacions de neurones corticals, resultant en un trencament de la comunicació entre les interneurones gabaèrgiques i les neurones glutamatèrgiques presents en les capes superiors de diferents regions del còrtex.

- Les AGC quinases dependents del PIF-pocket de PDK1, a través de les regions fisiològicament afectades del cervell, modulen les respostes davant l'estrès, així com els processos cognitius associats a la memòria a curt termini.

INTERÈS CIENTÍFIC

- El coneixement de la funció de les diferents AGC quinases en les diferents respostes cel·lulars ha de permetre l'estudi d'aproximacions farmacològiques més específiques per totes aquelles malalties associades a alteracions en la via de la PI3K.
- El ratolí *knockin* condicional L155E de PDK1 esdevé un bon model d'estudi del desenvolupament neuronal dependent de la via de la PI3K.
- Si arribem a establir, amb els experiments corresponents, el ratolí *knockin* condicional L155E de PDK1 com un model d'esquizofrènia, aquest esdevindrà un dels pocs models pels símptomes cognitius i negatius de la malaltia. Això ha de permetre l'estudi de fàrmacs específics per aquesta part de la simptomatologia, que es veu de fet agreujada amb els tractaments actuals, adreçats a combatre els símptomes positius.

PUBLICACIONES DERIVADAS

Cordón-Barris, L., Lydia Giménez-Llort, Claro, E., Lizcano, J. M. & Bayascas, J. R. Brain-specific mutation of the PDK1 substrate-docking site causes neurodevelopmental disorders leading to schizophrenia-like phenotypes. (Submitted).

Zhou, X., Cordon-Barris, L., Zurashvili, T. & Bayascas, J. R. Fine-tuning the intensity of the PKB/Akt signal enables diverse physiological responses. *Cell Cycle* 13, 3164–8 (2014).

Zurashvili, T. et al. Interaction of PDK1 with phosphoinositides is essential for neuronal differentiation but dispensable for neuronal survival. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1027–40 (2013).

BIBLIOGRAFIA

A

Ackermann, T., Kempe, D., Lang, F. & Lang, U. E. Hyperactivity and enhanced curiosity of mice expressing PKB/SGK-resistant glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Cell. Physiol. Biochem.* 25, 775–786 (2010).

Agarwal, N. K. et al. Rictor regulates cell migration by suppressing RhoGDI2. *Oncogene.* 32, 2521-2525 (2012).

Akbarian, S. & Huang, H.-S. Molecular and cellular mechanisms of altered GAD1/GAD67 expression in schizophrenia and related disorders. *Brain Res. Rev.* 52, 293–304 (2006).

Alberts, B. et al. *Molecular Biology of the Cell.* Amino Acids 54, 1725 (2008).

Alessi, D. R. et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr. Biol.* 7, 261–269 (1997).

Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A. & Cohen, P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 399, 333–338 (1996).

Allen, M. et al. HuD Promotes BDNF Expression in Brain Neurons via Selective Stabilization of the BDNF Long 3'UTR mRNA. *PLoS One* 8, (2013).

Anaka, K. et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699–1702 (1997).

Anderson, S. A., Marín, O., Horn, C., Jennings, K. & Rubenstein, J. L. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128, 353–63 (2001).

Anjum, R. & Blenis, J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 747–58 (2008).

Anticevic, A. & Corlett, P. R. Cognition-emotion dysinteraction in schizophrenia. *Front. Psychol.* 3, 1-18 (2012).

Arevalo, M. A. & Rodriguez-Tebar, A. Activation of CK2 and Inhibition of PTEN Phosphatase by NGF/p75NTR Inhibits GSK-3{beta} and Stimulates Axonal Growth. *Mol. Biol. Cell.* 8, 3369-77 (2006).

Arimura, Nariko and Kaibuchi, K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 194–205 (2007).

Aso, E. & Ferrer, I. Aso, E. & Ferrer, I. in *Understanding Alzheimer's Disease* (ed. Zerr, I.) 254–272 (InTech, 2013).

Assadi, A. H. et al. Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat. Genet.* 35, 270–6 (2003).

Ayala, R., Shu, T. & Tsai, L.-H. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128, 29–43 (2007).

B

Bago, R. et al. Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. *Biochem. J.* 463, 413–27 (2014).

Balendran, a et al. A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase C ζ (PKC ζ) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *J. Biol. Chem.* 275, 20806–13 (2000).

Barbacid, M. The Trk family of neurotrophin receptors. *Journal of Neurobiology* 25, 1386–1403 (1994).

Barnes, A. P. & Polleux, F. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 347–81 (2009).

Barnes, A. P. et al. LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell* 129, 549–63 (2007).

Barnes, A. P., Solecki, D. & Polleux, F. New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity in vivo. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 44–52 (2008).

Bartolini, G., Ciceri, G. & Marín, O. Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults. *Neuron* 79, 849–64 (2013).

Bayascas, J. Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. *Cell Cycle* 7, 2978–2982 (2008).

Bayascas, J. R. & Alessi, D. R. Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol. Cell* 18, 143–5 (2005).

Bayascas, J. R. et al. Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3258–72 (2008).

Bayascas, J. R. PDK1: the major transducer of PI 3-kinase actions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 346, 9–29 (2010).

Bayascas, J. R., Sakamoto, K., Armit, L., Arthur, J. S. C. & Alessi, D. R. Evaluation of approaches to generation of tissue-specific knock-in mice. *J. Biol. Chem.* 281, 28772–81 (2006).

Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 327–47 (2009).

Belova, L. et al. Ubiquitin-proteasome degradation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 (SGK-1) is mediated by the chaperone-dependent E3 ligase CHIP. *Biochem. J.* 400, 235–244 (2006).

Benedetti, B., Matyash, V. & Kettenmann, H. Astrocytes control GABAergic inhibition of neurons in the mouse barrel cortex. *J. Physiol.* 589, 1159–72 (2011).

Beneyto, M., Abbott, A., Hashimoto, T. & Lewis, D. a. Lamina-specific alterations in cortical GABA(A) receptor subunit expression in schizophrenia. *Cereb. Cortex* 21, 999–1011 (2011).

Biondi, R. M. et al. Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *EMBO J.* 19, 979–88 (2000).

Biondi, R. M. High resolution crystal structure of the human PDK1 catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site. *EMBO J.* 21, 4219–4228 (2002).

Böhmer, C. et al. Stimulation of the EAAT4 glutamate transporter by SGK protein kinase isoforms and PKB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1242–1248 (2004).

Boulbés, D. R., Shaiken, T. & Sarbassov, D. D. Endoplasmic reticulum is a main localization site of mTORC2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 46–52 (2011).

Braff, D. L. & Geyer, M. A. Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Arch. Gen. Psychiatry* 47, 181–188 (1990).

Brickley, D. R., Mikosz, C. A., Hagan, C. R. & Conzen, S. D. Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1). *J. Biol. Chem.* 277, 43064–43070 (2002).

Brownawell, A. M., Kops, G. J., Macara, I. G. & Burgering, B. M. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3534–3546 (2001).

Brugarolas, J. et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 18, 2893–2904 (2004).

Bruhn, M. a, Pearson, R. B., Hannan, R. D. & Sheppard, K. E. Second AKT: the rise of SGK in cancer signalling. *Growth Factors* 28, 394–408 (2010).

Brunet, a et al. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol. Cell. Biol.* 21, 952–65 (2001).

Brunet, A. et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011–5 (2004).

C

Calnan, D. R. & Brunet, A. The FoxO code. *Oncogene* 27, 2276–88 (2008).

Casamayor, A., Morrice, N. A. & Alessi, D. R. Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem. J.* 342 (Pt 2), 287–292 (1999).

Casamayor, A., Torrance, P., Kobayashi, T., Thorner, J. & Alessi, D. R. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr. Biol.* 9, 186–197 (1999).

Cellerino, A., Maffei, L. & Domenici, L. The distribution of brain-derived neurotrophic factor and its receptor trkB in parvalbumin-containing neurons of the rat visual cortex. *Eur J Neurosci* 8, 1190–1197 (1996).

Chardin, P. et al. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338–1343 (1993).

Chen, L. et al. Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. *J. Neurosci.* 27, 3884–3893 (2007).

Cheng, L., Locke, C. & Davis, G. W. S6 kinase localizes to the presynaptic active zone and functions with PDK1 to control synapse development. *J. Cell Biol.* 194, 921–35 (2011).

Cheng, P. L., Lu, H., Shelly, M., Gao, H. & Poo, M. M. Phosphorylation of E3 ligase smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. *Neuron* 69, 231–243 (2011).

Cho, K. S. et al. *Drosophila* phosphoinositide-dependent kinase-1 regulates apoptosis and growth via the phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6144–6149 (2001).

Choi, A. M. K., Ryter, S. W. & Levine, B. Autophagy in Human Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 651–662 (2013).

Choi, Y.-J. et al. Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation. *Genes Dev.* 22, 2485–95 (2008).

Chuang, J. H., Tung, L. C., Yin, Y. & Lin, Y. Differentiation of glutamatergic neurons from mouse embryonic stem cells requires raptor S6K signaling. *Stem Cell Res.* 11, 1117–1128 (2013).

Ciani, L. et al. Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10732–10737 (2011).

Cline, H. Synaptogenesis: A balancing act between excitation and inhibition. *Current Biology* 15, 203-5 (2005).

Coffinier, C. et al. Deficiencies in lamin B1 and lamin B2 cause neurodevelopmental defects and distinct nuclear shape abnormalities in neurons. *Mol. Biol. Cell* 22, 4683–93 (2011).

Cohen, P. & Goedert, M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 479–487 (2004).

Collins, B. J., Deak, M., Arthur, J. S. C., Armit, L. J. & Alessi, D. R. In vivo role of the PIF-binding docking site of PDK1 defined by knock-in mutation. *EMBO J.* 22, 4202–11 (2003).

Collins, B. J., Deak, M., Murray-Tait, V., Storey, K. G. & Alessi, D. R. In vivo role of the phosphate groove of PDK1 defined by knockin mutation. *J. Cell Sci.* 118, 5023–5034 (2005).

Compans, R. W. & Cooper, M. D. *Current Topics in Microbiology and Immunology Volume 320 Series Editors. Current Topics in Microbiology and Immunology* 338, 455–492 (2008).

Cosker, K. E. & Eickholt, B. J. Phosphoinositide 3-kinase signalling events controlling axonal morphogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 207–210 (2007).

Curley, A. a & Lewis, D. a. Cortical basket cell dysfunction in schizophrenia. *J. Physiol.* 590, 715–24 (2012).

Currie, R. A. et al. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem. J.* 337 (Pt 3, 575–583 (1999).

D

D’Arcangelo, G. et al. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719–723 (1995).

D’Arcangelo, G. Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. *Epilepsy Behav.* 8, 81–90 (2006).

Da Silva, J. S. & Dotti, C. G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 694–704 (2002).

Da Silva, J. S. et al. RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol.* 162, 1267–1279 (2003).

Das Sharma, S., Kraft, J. J., Miller, W. A. & Goss, D. J. Recruitment of 40S Ribosome to the 3' Untranslated Region (UTR) of a Viral mRNA, via the eIF4F Complex, Facilitates Cap-independent Translation. *J. Biol. Chem.* 290(18), 11268–81 (2015).

Datta, S., Brunet, A. & Greenberg, M. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 2905–2927 (1999).

Dazert, E. & Hall, M. N. mTOR signaling in disease. *Current Opinion in Cell Biology* 23, 744–755 (2011).

Deacon, R. M. J. Assessing nest building in mice. *Nat. Protoc.* 1, 1117–9 (2006).

Denaxa, M., Chan, C. H., Schachner, M., Parnavelas, J. G. & Karagogeos, D. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128, 4635–4644 (2001).

Dennis, M. D., Jefferson, L. S. & Kimball, S. R. Role of p70S6K1-mediated phosphorylation of eIF4B and PDCD4 proteins in the regulation of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 287, 42890–9 (2012).

DerMardirossian, C. & Bokoch, G. M. GDIs: Central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 15, 356–363 (2005).

Doble, B. W. and R.Woodgett, J. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 116, 1175–1186 (2003).

Dotti, C., Sullivan, C. & Banker, G. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. 8(4), 1454–1468 *J. Neurosci.* (1988)

Dummler, B. & Hemmings, B. A. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 231–5 (2007).

Durán, R. V. et al. Glutaminolysis Activates Rag-mTORC1 Signaling. *Mol. Cell* 47, 349–358 (2012).

E

Easton, R. M. et al. Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1869–78 (2005).

Ebneth, A., Drewes, G., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 44, 209–224 (1999).

Emamian, E. S. AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia. *Front. Mol. Neurosci.* 5, 33 (2012).

Emamian, E. S., Hall, D., Birnbaum, M. J., Karayiorgou, M. & Gogos, J. a. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat. Genet.* 36, 131–7 (2004).

Engelman, J. a, Luo, J. & Cantley, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7, 606–19 (2006).

Enriquez-Barreto, L., Palazzetti, C., Brennaman, L. H., Maness, P. F. & Fairén, A. Neural cell adhesion molecule, NCAM, regulates thalamocortical axon pathfinding and the organization of the cortical somatosensory representation in mouse. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5, (2012).

Erazo, T. et al. Canonical and kinase activity-independent mechanisms for extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) nuclear translocation require dissociation of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 complex. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1671–86 (2013).

Espinosa, A., Gil-Sanz, C., Yanagawa, Y. & Fairén, A. Two separate subtypes of early non-subplate projection neurons in the developing cerebral cortex of rodents. *Front. Neuroanat.* 3, 27 (2009).

F

Farhadi, H. F. et al. Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 20, 4059–4068 (2000).

Fazzari, P. et al. Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature* 464, 1376–1380 (2010).

Feng, Y. & Walsh, C. Mitotic Spindle Regulation by Nde1 Controls Cerebral Cortical Size. *Neuron* 44, 279–293 (2004).

Fishell, G. & Rudy, B. Mechanisms of inhibition within the telencephalon: “where the wild things are”. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 535–567 (2011).

Fortin, D. a et al. Live imaging of endogenous PSD-95 using ENABLED: a conditional strategy to fluorescently label endogenous proteins. *J. Neurosci.* 34, 16698–712 (2014).

Frame, S. & Cohen, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 359, 1–16 (2001).

Frödin, M. et al. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.* 21, 5396–5407 (2002).

Frödin, M., Jensen, C. J., Merienne, K. & Gammeltoft, S. A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO J.* 19, 2924–2934 (2000).

Frotscher, M. Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends Neurosci.* 33, 407–14 (2010).

Fu, C. et al. GABAergic interneuron development and function is modulated by the Tsc1 gene. *Cereb. Cortex* 22, 2111–2119 (2012).

G

Gan, X., Wang, J., Su, B. & Wu, D. Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 286, 10998–1002 (2011).

Gangloff, Y.-G. et al. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9508–9516 (2004).

Gao, D. et al. Rictor forms a complex with Cullin-1 to promote SGK1 ubiquitination and destruction. *Mol. Cell* 39, 797–808 (2010).

Gao, T., Furnari, F. & Newton, A. C. PHLPP: A phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol. Cell* 18, 13–24 (2005).

García-Martínez, J. M. & Alessi, D. R. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* 416, 375–85 (2008).

García-Mesa, Y. et al. Garcia-Mesa, Y.-2011. *J. Alzheimers. Dis.* 24, 421–54 (2011).

Garofalo, R. S. et al. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J. Clin. Invest.* 112, 197–208 (2003).

- Gärtner, A., Huang, X. & Hall, A. Neuronal polarity is regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3beta) independently of Akt/PKB serine phosphorylation. *J. Cell Sci.* 119, 3927–34 (2006).
- Gary, R. & Barde, Y. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 289–317 (1996).
- Gilbert, S. F. *Developmental Biology* -- NCBI Bookshelf. *Developmental Biology* (2000).
- Glausier, J. R. & Lewis, D. a. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 251, 90–107 (2013).
- Glausier, J. R., Fish, K. N. & Lewis, D. a. Altered parvalbumin basket cell inputs in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia subjects. *Mol. Psychiatry* 19, 30–6 (2014).
- Gomez, T. M., Robles, E., Poo, M. & Spitzer, N. C. Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science* 291, 1983–7 (2001).
- Gonitel, R. et al. DNA instability in postmitotic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3467–3472 (2008).
- Gonzalez, E. & McGraw, T. E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8, 2502–8 (2009).
- Goodman, L. J. et al. Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 222–38 (1996).
- Gotz, R. et al. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372, 266–269 (1994).
- Govek, E.-E., Newey, S. E. & Van Aelst, L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19, 1–49 (2005).

Gresset, A., Hicks, S. N., Harden, T. K. & Sondek, J. Mechanism of phosphorylation-induced activation of phospholipase C-gamma isozymes. *J. Biol. Chem.* 285, 35836–35847 (2010).

Gross, C. & Bassell, G. J. Neuron-specific regulation of class I PI3K catalytic subunits and their dysfunction in brain disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 12 (2014).

Guertin, D. a et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev. Cell* 11, 859–71 (2006).

Guo, J. & Anton, E. S. Decision making during interneuron migration in the developing cerebral cortex. *Trends Cell Biol.* 24, 342–51 (2014).

Gwinn, D. M. et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–26 (2008).

H

Haenschel, C. et al. Cortical oscillatory activity is critical for working memory as revealed by deficits in early-onset schizophrenia. *J. Neurosci.* 29, 9481–9489 (2009).

Han, J. M. et al. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* 149, 410–24 (2012).

Hanson, E. et al. Astrocytic glutamate uptake is slow and does not limit neuronal NMDA receptor activation in the neonatal neocortex. *Glia* (2015).

Harrington, L. S. et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 166, 213–223 (2004).

Harrison, P. J. & Weinberger, D. R. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry* 10, 40–68; image 5 (2005).

Hauge, C. et al. Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *EMBO J.* 26, 2251–61 (2007).

He, X.-L. & Garcia, K. C. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304, 870–5 (2004).

Herz, J. & Chen, Y. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 850–859 (2006).

Hevner, R. F., Neogi, T., Englund, C., Daza, R. a M. & Fink, A. Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 141, 39–53 (2003).

Heymach, J. V. & Shooter, E. M. The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270, 12297–12304 (1995).

Hilliard, M. A. & Bargmann, C. I. Wnt signals and Frizzled activity orient anterior-posterior axon outgrowth in *C. elegans*. *Dev. Cell* 10, 379–390 (2006).

Hirokawa, N., Niwa, S. & Tanaka, Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68, 610–38 (2010).

Hirotsune, S. et al. Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat. Genet.* 19, 333–9 (1998).

Hoekman, M. F. M., Jacobs, F. M. J., Smidt, M. P. & Burbach, J. P. H. Spatial and temporal expression of FoxO transcription factors in the developing and adult murine brain. *Gene Expr. Patterns* 6, 134–40 (2006).

Hu, W., MacDonald, M. L., Elswick, D. E. & Sweet, R. a. The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1338, 38–57 (2014).

Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–42 (2003).

Huang, H. & Tindall, D. J. Dynamic FoxO transcription factors. *J. Cell Sci.* 120, 2479–87 (2007).

Huang, J., Dibble, C. C., Matsuzaki, M. & Manning, B. D. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4104–15 (2008).

Hur, E.-M. & Zhou, F.-Q. GSK3 signalling in neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 539–51 (2010).

I

Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X. & Guan, K.-L. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* 27, 2270–2270 (2008).

Inagaki, N., Thoenen, H. & Lindholm, D. TrkA tyrosine residues involved in NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1125–1133 (1995).

J

Jia, K., Chen, D. & Riddle, D. TOR and Insulin Pathways Converge at Raptor to Regulate *C. elegans* Larval Development, Metabolism and Life Span. *Midwest Worm Meeting* (2004).

Jope, R. & Roh, M. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic Interventions. *Curr. Drug Targets* 7, 1421–1434 (2006).

Jope, R. S. Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 16 (2011).

Jope, R. S. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 441–3 (2003).

Jung, H., Yoon, B. C. & Holt, C. E. Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 308–24 (2012).

K

Kaplan, D. R. & Miller, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 381–391 (2000).

Kayser, M. S., Nolt, M. J. & Dalva, M. B. EphB Receptors Couple Dendritic Filopodia Motility to Synapse Formation. *Neuron* 59, 56–69 (2008).

Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie I. A. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide Implications. *Br. J. Cancer* 26, 239–257 (1972).

Kharebava, G., Makonchuk, D., Kalita, K. B., Zheng, J.-J. & Hetman, M. Requirement of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 for BDNF-mediated neuronal survival. *J. Neurosci.* 28, 11409–20 (2008).

Kim, E. & Sheng, M. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771–781 (2004).

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–41 (2011).

Kimura, H. et al. Identification of Rare, Single-Nucleotide Mutations in NDE1 and Their Contributions to Schizophrenia Susceptibility. *Schizophr. Bull.* 41, 744–53 (2015).

Kishi, M., Pan, Y. A., Crump, J. G. & Sanes, J. R. Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science* 307, 929–32 (2005).

Klein, R., Martin-Zanca, D., Barbacid, M. & Parada, L. F. Expression of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development* 109, 845–50 (1990).

Kobayashi, T. & Cohen, P. Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1). *Biochem. J* 328, 319–328 (1999).

Komander, D. et al. Structural insights into the regulation of PDK1 by phosphoinositides and inositol phosphates. *EMBO J.* 23, 3918–28 (2004).

Komander, D., Kular, G., Deak, M., Alessi, D. R. & van Aalten, D. M. F. Role of T-loop phosphorylation in PDK1 activation, stability, and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 280, 18797–802 (2005).

Kriegstein, A. R. & Noctor, S. C. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends in Neurosciences* 27, 392–399 (2004).

Kwiatkowski, D. J. & Manning, B. D. Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Hum. Mol. Genet.* 14 Spec No, R251–8 (2005).

L

Labelle, C. & Leclerc, N. Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 123, 1–11 (2000).

Lai, K. O., Fu, W. Y., Ip, F. C. & Ip, N. Y. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol. Cell. Neurosci.* 11, 64–76 (1998).

Lambert de Rouvroit, C. & Goffinet, A. M. Neuronal migration. *Mech. Dev.* 105, 47–56 (2001).

Lang, F., Strutz-Seebohm, N., Seebohm, G. & Lang, U. E. Significance of SGK1 in the regulation of neuronal function. *J. Physiol.* 588, 3349–54 (2010).

Lawlor, M. a et al. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J.* 21, 3728–38 (2002).

Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K. & Hempstead, B. L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–8 (2001).

Lemmon, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 99–111 (2008).

Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–93 (2012).

Lessmann, V., Gottmann, K. & Malsangio, M. Neurotrophin secretion: Current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology* 69, 341–374 (2003).

Levi-montalcini, B. Y. R. & Booker, B. Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve-growth protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 46, 384–391 (1960).

Levi-montalcini, R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 237, 1154–1161 (1987).

Lewis, D. a, Hashimoto, T. & Volk, D. W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 312–24 (2005).

Lewis, D. A. & Moghaddam, B. Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gamma-aminobutyric acid and glutamate alterations. *Arch. Neurol.* 63, 1372–1376 (2006).

Li, B., Woo, R. S., Mei, L. & Malinow, R. The Neuregulin-1 Receptor ErbB4 Controls Glutamatergic Synapse Maturation and Plasticity. *Neuron* 54, 583–597 (2007).

Lin, L., Doherty, D., Lile, J., Bektesh, S. & Collins, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* (80-.). 260, 1130–1132 (1993).

Lizcano, J. M. et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23, 833–43 (2004).

Losi, G., Mariotti, L., Carmignoto, G. & B, P. T. R. S. GABAergic interneuron to astrocyte signalling: a neglected form of cell communication in the brain
GABAergic interneuron to astrocyte signalling: a neglected form of cell communication in the brain. (2014).

Lucas, N. & Cho, W. Phosphatidylserine binding is essential for plasma membrane recruitment and signaling function of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J. Biol. Chem.* 286, 41265–41272 (2011).

M

Ma, H. et al. γ CaMKII Shuttles Ca^{2+} /CaM to the Nucleus to Trigger CREB Phosphorylation and Gene Expression. *Cell* 159, 281–294 (2014).

Magnuson, B., Ekim, B. & Fingar, D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem. J.* 441, 1–21 (2012).

Malagelada, C., Jin, Z. H. & Greene, L. A. RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation. *J. Neurosci.* 28, 14363–14371 (2008).

Malagelada, C., Jin, Z. H., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. & Greene, L. A. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 30, 1166–1175 (2010).

Malagelada, C., Ryu, E. J., Biswas, S. C., Jackson-Lewis, V. & Greene, L. A. RTP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigral neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. *J. Neurosci.* 26, 9996–10005 (2006).

Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261–74 (2007).

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–34 (2002).

Marín, O. & Müller, U. Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 26, 132–41 (2014).

Marín, O. & Rubenstein, J. L. R. Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 441–83 (2003).

Marín, O., Baker, J., Puellas, L. & Rubenstein, J. L. R. Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development* 129, 761–773 (2002).

Marín, O., Valiente, M., Ge, X. & Tsai, L. H. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, (2010).

Markowitz, S. D. & Bertagnolli, M. M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 2449–2460 (2009).

McManus, E. J. et al. The in vivo role of PtdIns(3,4,5)P₃ binding to PDK1 PH domain defined by knockin mutation. *EMBO J.* 23, 2071–82 (2004).

McPherson, P. S. et al. The brain ryanodine receptor: A caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron* 7, 17–25 (1991).

Ménager, C., Arimura, N., Fukata, Y. & Kaibuchi, K. PIP₃ is involved in neuronal polarization and axon formation. *J. Neurochem.* 89, 109–18 (2004).

Meyer, G., Soria, J. M., Martínez-Galán, J. R., Martín-Clemente, B. & Fairén, A. Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *J. Comp. Neurol.* 397, 493–518 (1998).

Meyer, H. S. et al. Inhibitory interneurons in a cortical column form hot zones of inhibition in layers 2 and 5A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16807–12 (2011).

Mines, M. a, Yuskaitis, C. J., King, M. K., Beurel, E. & Jope, R. S. GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PLoS One* 5, e9706 (2010).

Minzenberg, M. J. et al. Gamma oscillatory power is impaired during cognitive control independent of medication status in first-episode schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 35, 2590–9 (2010).

Miyamoto, Y. & Nitta, A. Behavioral Phenotypes for Negative Symptoms in Animal Models of Schizophrenia. *J. Pharmacol. Sci.* 126, 310–320 (2014).

Moeller, M. L., Shi, Y., Reichardt, L. F. & Ethell, I. M. EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation. *J. Biol. Chem.* 281, 1587–98 (2006).

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L. & Macklis, J. D. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 427–37 (2007).

Mora, A. et al. Deficiency of PDK1 in cardiac muscle results in heart failure and increased sensitivity to hypoxia. *EMBO J.* 22, 4666–4676 (2003).

Mora, A., Lipina, C., Tronche, F., Sutherland, C. & Alessi, D. R. Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure. *Biochem. J.* 385, 639–648 (2005).

Moschner, K. et al. RNA protein granules modulate tau isoform expression and induce neuronal sprouting. *J. Biol. Chem.* 289, 16814–16825 (2014).

N

Najafov, A., Shpiro, N. & Alessi, D. R. Akt is efficiently activated by PIF-pocket- and PtdIns (3,4,5)P₃-dependent mechanisms leading to resistance to PDK1 inhibitors. *Biochem. J.* 448, 285–95 (2012).

Newton, A. C. Protein Kinase C: Structural and Spatial Regulation by Phosphorylation, Cofactors, and Macromolecular Interactions. *Chem. Rev.* 101, 2353–2364 (2001).

Newton, A. C. Protein kinase C: poised to signal. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E395–402 (2010).

Nicklin, P. et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136, 521–34 (2009).

Nimnual, A. S., Yatsula, B. A. & Bar-Sagi, D. Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 279, 560–563 (1998).

O

Okamoto, M. et al. DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Ndel1 dual-phosphorylation. *J. Neurosci.* 35, 2942–58 (2015).

Oppenheim, R. W. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453–501 (1991).

Orita, T. & Sobue, K. Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 27734–45 (2009).

Ota, K. T. et al. REDD1 is essential for stress-induced synaptic loss and depressive behavior. *Nat. Med.* 20, 531–5 (2014).

P

Paradis, S., Ailion, M., Toker, A., Thomas, J. H. & Ruvkun, G. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 13, 1438–1452 (1999).

Park, H. & Poo, M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23 (2013).

Park, J. et al. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 18, 3024–3033 (1999).

Pearce, L. R., Komander, D. & Alessi, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 9–22 (2010).

Pearce, L. R., Sommer, E. M., Sakamoto, K., Wullschleger, S. & Alessi, D. R. Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem. J.* 436, 169–79 (2011).

Pearson, G. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153–83 (2001).

Popken, G. J., Bunney, W. E., Potkin, S. G. & Jones, E. G. Subnucleus-specific loss of neurons in medial thalamus of schizophrenics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9276–9280 (2000).

Prickaerts, J. et al. Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3beta: a putative model of hyperactivity and mania. *J. Neurosci.* 26, 9022–9029 (2006).

Pullen, N. et al. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 279, 707–710 (1998).

R

Raju, C. S. et al. In neurons, activity-dependent association of dendritically transported mRNA transcripts with the transacting factor CBF-A is mediated by A2RE/RTS elements. *Mol. Biol. Cell* 22, 1864–77 (2011).

Rakic, P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145, 61–83 (1972).

Ramakrishnan, G. et al. Sirt2 deacetylase is a novel AKT binding partner critical for AKT activation by insulin. *J. Biol. Chem.* 289, 6054–66 (2014).

Raman, M., Chen, W. & Cobb, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100–3112 (2007).

Ranganathan, A., Yazicioglu, M. N. & Cobb, M. H. The nuclear localization of ERK2 occurs by mechanisms both independent of and dependent on energy. *J. Biol. Chem.* 281, 15645–15652 (2006).

Reichardt, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1545–64 (2006).

Robinson, M. J. & Cobb, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180–6 (1997).

Rodríguez-Asiain, A. et al. Brain specific kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid rafts: modulation of kinase activity by lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 1124–35 (2011).

Rogers, D. C. et al. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm. Genome* 8, 711–713 (1997).

Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P. & Blenis, J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13489–13494 (2004).

Ruiz Babot, G. Regulació de la Brain-specific Kinase 1 (BRSK1) neuronal per sulfàtid i modificacions post-traduccionals. 135–239 (UAB, 2013).

Russell, R. C., Yuan, H.-X. & Guan, K.-L. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* 24, 42–57 (2014).

Saci, A., Cantley, L. C. & Carpenter, C. L. Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol. Cell* 42, 50–61 (2011).

Salih, D. a M. et al. FoxO6 regulates memory consolidation and synaptic function. *Genes Dev.* 26, 2780–801 (2012).

Salinas, P. C. & Price, S. R. Cadherins and catenins in synapse development. *Current Opinion in Neurobiology* 15, 73–80 (2005).

Sancak, Y. et al. PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Mol. Cell* 25, 903–915 (2007).

Sancak, Y. et al. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290–303 (2010).

Sancak, Y. et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496–501 (2008).

Santos Da Silva, J., Schubert, V. & Dotti, C. G. RhoA, Rac1, and cdc42 intracellular distribution shift during hippocampal neuron development. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 1–7 (2004).

Sapkota, G. P. et al. Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90(RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys(433), is essential for LKB1 to suppress cell vrowth. *J. Biol. Chem.* 276, 19469–82 (2001).

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–101 (2005).

Sasaki, S. et al. Complete loss of Ndel1 results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7812–7827 (2005).

Sasaoka, T. & Kobayashi, M. The Functional Significance of Shc in Insulin Signaling as a Substrate of the Insulin Receptor. *Endocr. J.* 47, 373–381 (2000).

Saura, C. a & Valero, J. The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Rev. Neurosci.* 22, 153–69 (2011).

Schneider, R. & Schweiger, M. A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene* 6, 1807–1811 (1991).

Schwamborn, J. C. & Püschel, A. W. The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* 7, 923–9 (2004).

Seoane, J., Le, H. Van, Shen, L., Anderson, S. A. & Massagué, J. Integration of smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117, 211–223 (2004).

Shahbazian, D. et al. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J.* 25, 2781–2791 (2006).

Shang, L. et al. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4788–93 (2011).

Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G. & Poo, M.-M. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129, 565–77 (2007).

Shi, S.-H., Jan, L. Y. & Jan, Y.-N. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112, 63–75 (2003).

Shima, H. et al. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* 17, 6649–6659 (1998).

Shoshani, T. et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2283–2293 (2002).

Simon, P., Dupuis, R. & Costentin, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav. Brain Res.* 61, 59–64 (1994).

Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O. & Deisseroth, K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698–702 (2009).

Soler, R. M. et al. Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J. Neurosci.* 19, 9160–9 (1999).

Song, M. S. & Posse De Chaves, E. I. Inhibition of rat sympathetic neuron apoptosis by ceramide. Role of p75^{NTR} in ceramide generation. *Neuropharmacology* 45, 1130–1150 (2003).

Spitzer, N. C. Activity-dependent neuronal differentiation prior to synapse formation: The functions of calcium transients. in *Journal of Physiology Paris* 96, 73–80 (2002).

Sundaresan, N. R. et al. The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Sci. Signal.* 4, ra46 (2011).

T

Takahashi, H. et al. Postsynaptic TrkC and presynaptic PTP σ function as a bidirectional excitatory synaptic organizing complex. *Neuron* 69, 287–303 (2011).

- Tato, I., Bartrons, R., Ventura, F. & Rosa, J. L. Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *J. Biol. Chem.* 286, 6128–42 (2011).
- Tenbaum, S. P. et al. β -catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nat. Med.* 18, 892–901 (2012).
- Thoenen, H. & Barde, Y. A. Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 60, 1284–1335 (1980).
- Thoenen, H. Neurotrophins and Neuronal Plasticity. *Science* 270, 593-97 (1995)
- Thomanetz, V. et al. Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *J. Cell Biol.* 201, 293–308 (2013).
- Thune, J. J., Uylings, H. B. & Pakkenberg, B. No deficit in total number of neurons in the prefrontal cortex in schizophrenics. *J. Psychiatr. Res.* 35, 15–21 (2001).
- Tomita, K., Kubo, K. ichiro, Ishii, K. & Nakajima, K. Disrupted-in-schizophrenia-1 (Disc1) is necessary for migration of the pyramidal neurons during mouse hippocampal development. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2834–2845 (2011).
- Torres-Lista, V. & Giménez-Llort, L. Impairment of nesting behaviour in 3xTg-AD mice. *Behav. Brain Res.* 247, 153–157 (2013).
- Tronche, F. et al. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* 23, 99–103 (1999).
- Tschopp, O. et al. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132, 2943–54 (2005).

Tsokas, P. et al. Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *J. Neurosci.* 25, 5833–5843 (2005).

Tsokas, P., Ma, T., Iyengar, R., Landau, E. M. & Blitzer, R. D. Mitogen-activated protein kinase upregulates the dendritic translation machinery in long-term potentiation by controlling the mammalian target of rapamycin pathway. *J. Neurosci.* 27, 5885–5894 (2007).

Turner, J. E., Barde, Y. A., Schwab, M. E. & Thoenen, H. Extract from brain stimulates neurite outgrowth from fetal rat retinal explants. *Brain Res.* 282, 77–83 (1982).

U

Ulhati, P. et al. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res.* 71, 3246–3256 (2011).

Ultsch, M. H. et al. Crystal Structures of the Neurotrophin-binding Domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J. Mol. Biol.* 290, 149–159 (1999).

Ung, H., Gkogkas, C. G., Sonenberg, N. & Holt, C. E. Remote control of gene function by local translation. *Cell* 157, 26–40 (2014).

Urbanska, M., Gozdz, A., Swiech, L. J. & Jaworski, J. Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 287, 30240–56 (2012).

V

Vaghi, V. et al. Rac1 and Rac3 GTPases control synergistically the development of cortical and hippocampal GABAergic interneurons. *Cereb. Cortex* 24, 1247–1258 (2014).

Van der Vos, K. E. et al. Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy. *Nat. Cell Biol.* 14, 829–37 (2012).

Vander Haar, E., Lee, S.-I., Bandhakavi, S., Griffin, T. J. & Kim, D.-H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 9, 316–323 (2007).

Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. & Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 329–41 (2010).

Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G. & Waterfield, M. D. Phosphoinositide 3-kinases: A conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22, 267–272 (1997).

Vanhaesebroeck, B., Stephens, L. & Hawkins, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 195–203 (2012).

Volman, V., Behrens, M. M. & Sejnowski, T. J. Downregulation of Parvalbumin at Cortical GABA Synapses Reduces Network Gamma Oscillatory Activity. *Journal of Neuroscience* 31, 18137–18148 (2011).

W

Walsh, D. & Mohr, I. Coupling 40S ribosome recruitment to modification of a cap-binding initiation factor by eIF3 subunit e. *Genes Dev.* 28, 835–840 (2014).

Wang, H.-R. et al. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 302, 1775–9 (2003).

Wang, Q. J. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 317–323 (2006).

Webb, A. E. & Brunet, A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem. Sci.* 39, 159–69 (2014).

Webb, A. et al. FOXO3 shares common targets with ASCL1 genome-wide and inhibits ASCL1-dependent neurogenesis. *Cell Rep.* 4, 477–491 (2013).

Weickert, C. S. et al. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 8, 592–610 (2003).

Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H. & de Vos, A. M. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 401, 184–8 (1999).

Wildonger, J., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. The Tsc1-Tsc2 complex influences neuronal polarity by modulating TORC1 activity and SAD levels. *Genes Dev.* 22, 2447–53 (2008).

Williams, M. R. et al. The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr. Biol.* 10, 439–448 (2000).

Winckler, B. BDNF instructs the kinase LKB1 to grow an axon. *Cell* 129, 459–60 (2007).

Wisdom, R., Johnson, R. S. & Moore, C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* 18, 188–97 (1999).

Wu, D. & Pan, W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* 35, 161–8 (2010).

Wynshaw-Boris, a. Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clin. Genet.* 72, 296–304 (2007).

X

Xie, Z., Dong, Y., Scholz, R., Neumann, D. & Zou, M.-H. Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced

activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation* 117, 952–62 (2008).

Xu, J., Dang, Y., Ren, Y. R. & Liu, J. O. Cholesterol trafficking is required for mTOR activation in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4764–4769 (2010).

Y

York, R. D. et al. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392, 622–626 (1998).

Yoshimura, T. et al. Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 62–68 (2006).

Z

Zhang, H. H. et al. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS One* 4, e6189 (2009).

Zheng, W. et al. The possible role of the Akt signaling pathway in schizophrenia. *Brain Research* 1470, 145–158 (2012).

Zhou, R. & Snyder, P. M. Nedd4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.* 280, 4518–4523 (2005).

Zhou, X., Cordon-Barris, L., Zurashvili, T. & Bayascas, J. R. Fine-tuning the intensity of the PKB/Akt signal enables diverse physiological responses. *Cell Cycle* 13, 3164–8 (2014).

Zoncu, R. et al. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* 334, 678–83 (2011).

Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 21–35 (2011).

Zurashvili, T. et al. Interaction of PDK1 with phosphoinositides is essential for neuronal differentiation but dispensable for neuronal survival. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1027–40 (2013).

VISUAL ABSTRACT

