

Universitat de Lleida

FLRT3: mecanismes moleculars de senyalització en el desenvolupament dels axons talamocorticals

Maria José Menal Castellote

Dipòsit Legal: L.1443-2015
<http://hdl.handle.net/10803/314170>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Universitat de Lleida

**FLRT3:
mecanismes moleculars de
senyalització en el
desenvolupament dels axons
talamocorticals**

Memòria de Tesi Doctoral presentada per:

Maria José Menal Castellote

Doctorat en Salut

Director de Tesi:

Joaquim Egea Navarro, PhD

2015



Universitat de Lleida



**FLRT3: mecanismes moleculars de senyalització en el desenvolupament dels axons
talamocorticals**

Memòria de tesi doctoral presentada per Maria José Menal Castellote per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida.

Treball realitzat a l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida) a la Unitat *Molecular and Developmental Neurobiology* del grup consolidat Cicle Cel·lular del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida, sota la direcció del Doctor Joaquim Egea Navarro.

El treball realitzat en aquesta tesi doctoral ha estat finançat pels projectes de recerca del Ministerio de Economía y Competitividad *Function of the FLRT Family of LRR Proteins in the Nervous System Development and Connectivity* (BFU2010-18055) i pel Career Integration Grant de la UE (programa Marie Curie) *Novel Molecular Mechanisms of Neuron Migration in the Developing Cortex and their Contribution to Related Diseases* (Neuromigration, 293980). La doctoranda Maria José Menal Castellote ha gaudit durant aquest temps d'una beca predoctoral del Ministerio de Ciencia e Innovación, BES-2011-043651.

Lleida, 8 de Juny de 2015.

Doctorand

Director de tesi

Maria José Menal Castellote

Dr. Joaquim Egea Navarro

ÍNDEX

ÍNDEX	5
AGRAÏMENTS	11
ABREVIACIONS	15
RESUM	21
INTRODUCCIÓ	31
1. Desenvolupament del sistema nerviós	33
1.1 Migració neuronal	33
1.2 Guia axonal	39
1.3 Formació de sinapsis	42
2. Mecanismes moleculars de guia axonal	44
2.1 Molècules de guia axonal i els seus receptors	45
2.1.1 <i>Slit i els receptors Robo</i>	46
2.1.2 <i>Netrines i els receptors DCC i Unc5</i>	48
2.1.3 <i>Efrines i els receptors Eph</i>	50
2.1.4 <i>Semaforines i els seus receptors</i>	52
2.1.5 <i>Altres molècules de guia axonal: Morfògens, Factors de Creixement i Molècules d'adhesió</i>	55
2.1.6 <i>Noves molècules de guia axonal: FLRTs</i>	56
2.2 Senyalització en el con de creixement	61
2.2.1 <i>Segons missatgers</i>	62
2.2.2 <i>Traducció local</i>	63
2.2.3 <i>RhoGTPases</i>	65
2.2.4 <i>Endocitosi i exocitosi de receptors</i>	69
2.2.5 <i>Processament de receptors</i>	71
2.3 Integració de les molècules de guia axonal	72
3. Guia axonal en els principals tractes axonals del prosencèfal	77
3.1 Projeccions calloses	79
3.2 Projeccions corticoespinals	82
3.3 Projeccions corticotalmiques i talamocorticals	85

3.3.1	<i>Desenvolupament de les projeccions corticotalàmiques</i>	85
3.3.2	<i>Desenvolupament de les projeccions talamocorticals</i>	88
3.3.3	<i>Hipòtesi “Hand Shake”</i>	91
3.3.4	<i>Topografia de les projeccions talamocorticals</i>	92
3.3.5	<i>Formació del “corridor”. Regió instructiva pels TCAs</i>	96
3.3.6	<i>Guia axonal dels axons talamocorticals</i>	98
	OBJECTIUS	101
	MATERIAL I MÈTODES	105
1.	Doble híbrid	107
2.	Cultiu i Transfecció de la línia HEK293T	108
3.	Cultiu primari de neurones rostrals del tàlem	109
4.	Co-immunoprecipitació	111
4.1	<i>In vitro</i>	111
4.2	En cèl·lules HEK293T	111
4.3	En cultius primaris	111
5.	Assaig de biotinització	112
6.	Assaig amb Fosfatasa Alkalina (AP)	113
7.	Immunofluorescència	113
7.1	En cèl·lules HEK293T i cultius primaris	113
7.2	Doble immunofluorescència en cultius primaris	114
8.	Western-blot	114
9.	Anticossos	115
10.	Clonatges	119
11.	DNAs utilitzats	120
12.	PCR <i>FLRT3</i>^{-/-}	121
13.	Drogues utilitzades i proteïna recombinant	122
14.	Estadística	123

RESULTATS	125
1. Gens candidats que interaccionen amb el domini intracel·lular de FLRT3	127
2. Interacció entre FLRT3 i Robo1.....	133
3. El domini intracel·lular de Robo1 és necessari per la interacció.....	138
4. Especificitat de la interacció FLRT3-Robo1	140
5. FLRT3 interacciona amb més afinitat amb un fragment de Robo1 que amb la proteïna sencera	142
6. FLRT3 segresta Robo1-CTF a la membrana	145
7. Processament de Robo1 en cèl·lules HEK293T.....	151
8. Interacció de FLRT3 i Robo1 en el tàlem.....	156
9. Processament de Robo1 per metaloproteases en el tàlem	160
10. FLRT3 i Robo1 intervenen en la guia axonal dels TCA rostrals.....	170
11. Senyalització en els TCA rostrals	172
12. Relació entre FLRT3 – Robo1 – DCC – Netrin.....	175
DISCUSSIÓ	187
1. Interacció FLRT3-Robo1	189
2. La senyalització a través de ROCK promou atracció.....	191
3. Combinació de molècules de guia axonal: Slit i Netrin, juntes promouen atracció	195
4. Processament de Robo1 per metaloproteases en el tàlem rostral.....	200
CONCLUSIONS	205
TREBALL FUTUR.....	209
BIBLIOGRAFIA.....	213
ANNEX.....	249

AGRAÏMENTS

En primer lloc vull donar les gràcies al Dr. Joaquim Egea per donar-me la oportunitat de realitzar la meva tesi doctoral en el seu grup anomenat Molecular and Developmental Neurobiology de la Universitat de Lleida.

També vull donar les gràcies a dues persones molt importants per mi que m'han ajudat al llarg d'aquests d'anys, la Inma i el Serafí. De forma incondicional sempre han estat al meu costat, quan les coses han anat bé i sobretot quan no ho han anat tant. Pels seus savis consells, per dedicar-me part del seu temps, per ensenyar-me tot el que saben, per ajudar-me sempre, pels dinars junts, per les birres de les tardes... I per molt més **MOLTES GRÀCIES!!** Sou els millors!

Gràcies també als membres del grup, als que estan ara i als que ja han marxat. En especial a l'Alessandro, un estudiant d'Erasmus, que va ser un company extraordinari.

També vull donar les gràcies a totes les persones que no sent del meu grup m'han ajudat en algun moment, i en especial a l'Eloi Garí i al Mario Encinas per totes les vegades que m'han explicat procediments o m'han resolt dubtes.

Vull agrair també a tots els treballadors de l'estabulari que sempre han set molt atents amb mi. També gràcies a tots els ratolins que han donat la seva vida per la meva tesi.

I per últim gràcies als meu pares que m'han donat l'oportunitat d'arribar fins aquí, a l'Albert per estar sempre al meu costat i als meus amics.

ABREVIACIONES

AEP: Àrea anterior entopeduncular

AMPc: Adenosina monofosfat cíclic

AVE: Endoderm visceral anterior

CGE: Eminència ganglionar caudal

CP: Placa cortical

CPN: Neurones de projecció callosa

CTA: Axons corticotalàmics

CThPN: Neurones de projecció corticotalàmica

DCC: Deleccionat en càncer colo-rectal

dLGN: Nucli geniculat lateral dorsal

DTB: Límit diencèfal-telencèfal

E: Dia embrionari

Eix AP: eix anterior-posterior

EMT: Transició epitel·li-mesènquima

F-actina: Filaments d'actina

FGF: Factor de creixement de fibroblasts

FLRT3: Fibronectin leucine-rich transmembrane protein

GAP: Proteïna activadora de GTPases

GDP: Guanosina difosfat

GEF: Factor d'intercanvi de nucleòtids guanina

GMPc: Guanosina monofosfat cíclic

GN: Neurones granulars

GP: Globus pà·lid

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

GTP: Guanosina trifosfat

GW: Glial wedge

ICD: Domini intracel·lular

IGG: Glia indusium griseum

IP: Progenitors intermedis

IZ: Zona intermèdia

Kuz: Kuzbanian

LGE: Eminència ganglionar lateral

LPHN: Latrofilina

MGE: Eminència ganglionar medial

MGN: Nucli geniculat medial

MLCK: quinasa de la cadena lleugera de la miosina

MZ: Zona marginal

MZG: Midline zipper glia

NCAM: Molècula d'adhesió neuronal

Ncx: Escorça cerebral en desenvolupament

NE: Cèl·lules neuroepitelials

NOS: Sintasa òxid nítric

Npn: Neuropilina

oRG: Cèl·lules glia radial exteriors

PAK: Quinasa activada per p21

PAPC: Protocadherina paraxial

PKA: Proteïna quinasa A

PKC: Proteïna quinasa C

PoA: Àrea preòptica

PP: Preplaca

PRN: Nucli talàmic perireticular

PS: Línia primitiva

PSPB: Límit pal·lial-subpal·lial

RG: Cèl·lules glia radials

RGC: Cèl·lules ganglionars de la retina

Robo1: Roundabout

ROCK: ROC quinasa

RTN: Nucli talàmic reticular

SCPN: Neurones de projecció subcerebral

Sema: Semaforina

Sos: Son of sevenless

SP: Subplaca

SPN: Neurones de la subplaca

SS: Circumvolució subcallosa

St/Str: Estriat

TCA: Axons talamocorticals

Th: Tàlem

SVZ: Zona subventricular

VB: Nucli ventrobasal

VL: Nucli ventrolateral

VZ: Zona ventricular

RESUM

FLRT3 (Fibronectin Leucine-Rich Transmembrane protein) és un dels tres membres que forma una família de proteïnes transmembrana que ha estat implicat en processos d'adhesió cel·lular i de repulsió neuronal. En el moment de començar aquesta tesi les funcions descrites pels FLRTs eren funcions cel·lulars no autònomes i gairebé no es tenia coneixença dels possibles mecanismes de senyalització intracel·lular. No obstant, la nostra hipòtesi era que sí que en tenien donats alguns dels resultats que s'havien publicat com la interacció de FLRT3 amb Rnd o la fosforilació de FLRT1 per FGFR1. En el nostre estudi mitjançant la tècnica doble híbrid i la posterior comprovació en cèl·lules HEK293T i en cultius primaris de neurones talàmiques hem trobat que FLRT3 interacciona amb Robo1, un dels quatre membres de la família de receptors Robo que està implicat en processos de guia axonal i de migració neuronal, entre altres. Robo1 és receptor d'una de les molècules de guia axonal millor caracteritzades, Slit, i després de la seva activació per Slit, desencadena una senyalització que indueix repulsió.

En els nostres resultats en cèl·lules HEK293T hem vist que FLRT3 i Robo1 interaccionen en *cis* mitjançant els seus dominis intracel·lulars i que els dominis conservats de Robo1, CC1, CC2 i CC3, intervenen en la interacció. Hem vist que la co-expressió de FLRT3 amb Robo1 indueix el processament d'aquest últim i a més a més hem trobat que FLRT3 interacciona amb el fragment processat que conté la part intracel·lular de Robo1 amb major afinitat que amb la forma sencera i que el segresta a la membrana. La unió FLRT3-Robo1 sembla que és constitutiva donat que no és modulada per la presència del lligand de Robo1, Slit1. No obstant, en presència del lligand Slit1, es produeix un increment en el processament de Robo1 i el fragment intracel·lular que es genera és captat per FLRT3. Els mateixos resultats es van poder observar en cultius primaris de neurones talàmiques demostrant que el segrest del fragment processat de Robo1 per part de FLRT3 té lloc en un context més fisiològic i, per tant, pot ser rellevant per la funció de Robo1. A més, donat que el processament de Robo1 i l'alliberament del fragment que conté la part intracel·lular cap al citoplasma està implicat en la seva senyalització intracel·lular que dona lloc a un efecte repulsiu, suggerim que FLRT3 inhibeix segurament aquesta senyalització, segrestant el fragment processat a la membrana plasmàtica.

FLRT3 i Robo1 es co-expressen en els axons talamocorticals rostrals a E13.5 i hem pogut demostrar que ambdós proteïnes també interaccionen en cultius primaris de neurones talàmiques. La interacció passa en un moment del desenvolupament on Robo1 juga un paper clau en la projecció topogràfica dels axons talàmics cap a l'escorça i per tant, aquesta interacció suggeriria que FLRT3 pogués estar regulant aquesta funció de Robo1. En efecte, en un estudi on hem col·laborat amb dos laboratoris més, hem vist que la interacció entre FLRT3 i Robo1 és necessària per la correcta projecció dels axons talamocorticals rostrals cap a l'escorça motora. Els mecanismes de senyalització implicats en aquest procés no es coneixen del tot, però un dels passos claus és l'increment de receptors DCC a la membrana plasmàtica del con de creixement d'aquests axons que fa que Netrin1 tingui un efecte atractiu. Els nostres col·laboradors han vist que l'activitat PKA està implicada en aquest increment de receptors DCC a la membrana, però no sembla que sigui la única via de senyalització implicada ja que nosaltres hem vist que l'activitat de ROCK també és necessària per aquest increment. Si existeix "crosstalk" entre la via PKA i la de ROCK és encara una qüestió important en aquest sistema. Per tant, d'alguna manera, FLRT3 juntament amb Robo1 a la membrana i ROCK i PKA, com a elements de senyalització intracel·lular, intervenen en el correcte posicionament dels axons talamocorticals rostrals.

En resum, i en el context de les neurones talàmiques rostrals, els nostres resultats indiquen que, per una banda, FLRT3 regula directament i de forma negativa la senyalització repulsiva Slit1/Robo1 segurament segregant el fragment processat de Robo1 a la membrana plasmàtica; d'altra banda, FLRT3 estaria canviant la senyalització de Robo1 cap l'activació de vies com la de la PKA i ROCK que induirien un increment de receptors DCC a la membrana i la senyalització atractiva per Netrin1. FLRT3 en aquest cas, és clau per convertir la senyalització de Robo1 de repulsiva a permetre l'atracció de Netrin1 i explica com molècules aparentment d'activitat contrària (Slit1, repulsiu i Netrin1, atractiu) poden cooperar per la correcta projecció, en aquest cas, dels axons talamocorticals rostrals. Aquest tipus de mecanismes incrementen les possibilitats de resposta dels axons a una limitada quantitat de molècules de guia axonal.

FLRT3 (Fibronectin Leucine-Rich Transmembrane protein) es uno de los tres miembros que constituye una familia de proteínas transmembrana a la cual se han asociado procesos de adhesión celular y de repulsión neuronal. En el momento de empezar esta tesis las funciones descritas para los FLRTs eran funciones celulares no autónomas y casi no se tenía conocimiento de los posibles mecanismos de señalización intracelular. Sin embargo, nuestra hipótesis era que sí que los tenían dados algunos de los resultados que se habían publicado hasta la fecha, como la interacción de FLRT3 con Rnd o la fosforilación de FLRT1 por FGFR1. En nuestro estudio mediante la técnica doble híbrido y la posterior comprobación en células HEK293T y en cultivos primarios de neuronas talámicas hemos encontrado que FLRT3 interacciona con Robo1, uno de los cuatro miembros de la familia de receptores Robo, la cual está implicada en procesos de guía axonal y de migración neuronal, entre otros. Robo1 es receptor de una de las moléculas de guía axonal mejor caracterizadas, Slit, y después de su activación mediante Slit, desencadena una señalización que induce repulsión.

Nuestros resultados en células HEK293T muestran que FLRT3 y Robo1 interaccionan en *cis* mediante sus dominios intracelulares y que los dominios conservados de Robo1, CC1, CC2 i CC3, intervienen en la interacción. Hemos visto que la co-expresión de FLRT3 con Robo1 induce el procesamiento de este último y además hemos encontrado que FLRT3 interacciona con el fragmento procesado, que contiene la parte intracelular de Robo1, con más afinidad que con la forma entera y que lo secuestra en la membrana. La unión FLRT3-Robo1 parece ser constitutiva dado que no se modula por la presencia del ligando de Robo1, Slit1. Sin embargo, en presencia del ligando Slit1, se produce un incremento en el procesamiento de Robo1 y el fragmento intracelular que se forma es captado por FLRT3. Los mismos resultados se pudieron observar en cultivos primarios de neuronas talámicas demostrando que el secuestro del fragmento procesado de Robo1 por parte de FLRT3 se da en un contexto más fisiológico y, por tanto, puede ser relevante para la función de Robo1. Además, dado que el procesamiento de Robo1 y la liberación del fragmento que contiene la parte intracelular hacia el citoplasma está implicada en su señalización intracelular que da lugar a un efecto repulsivo, sugerimos que FLRT3 inhibe seguramente esta

señalización, secuestrando al fragmento procesado en la membrana plasmática.

FLRT3 y Robo1 se co-expresan en los axones talamocorticales rostrales a E13.5 y hemos podido demostrar que las dos proteínas también interactúan en cultivos primarios de neuronas talámicas. La interacción tiene lugar en un momento del desarrollo en que Robo1 tiene un papel muy importante en la proyección topográfica de los axones talámicos hacia la corteza y por lo tanto, esta interacción sugeriría que FLRT3 podría estar regulando esta función de Robo1. En efecto, en un estudio donde hemos colaborado con dos laboratorios más, hemos visto que la interacción entre FLRT3 y Robo1 es necesaria para la correcta proyección de los axones talamocorticales rostrales hacia la corteza motora. Los mecanismos de señalización implicados en este proceso no se conocen del todo, pero uno de los pasos clave es el incremento de receptores DCC en la membrana plasmática del cono de crecimiento de estos axones que hace que Netrin1 tenga un efecto atractivo. Nuestros colaboradores han visto que la actividad PKA está implicada en este incremento de receptores DCC en la membrana, pero no parece que sea la única vía de señalización implicada ya que nosotros hemos visto que la actividad de ROCK también es necesaria para este incremento. Si existe “crosstalk” entre la vía PKA y la de ROCK es todavía una cuestión importante en este sistema. Por tanto, de alguna manera, FLRT3 junto con Robo1 en la membrana y ROCK y PKA, como elementos de señalización intracelular, intervienen en el correcto posicionamiento de los axones talamocorticales rostrales.

En resumen, y en el contexto de las neuronas talámicas rostrales, nuestros resultados indican que, por un lado, FLRT3 regula directamente y de forma negativa la señalización repulsiva Slit1/Robo1 seguramente secuestrando el fragmento procesado de Robo1 en la membrana plasmática; y por otro lado, FLRT3 estaría cambiando la señalización de Robo1 hacia la activación de vías como la de PKA y ROCK que inducirían un incremento de receptores DCC en la membrana y la señalización atractiva por Netrin1. FLRT3 en este caso, es fundamental para convertir la señalización de Robo1 de repulsiva a permitir la atracción de Netrin1 y explica como moléculas aparentemente con actividad contraria (Slit1, repulsiva i Netrin1, atractiva) pueden cooperar para la correcta proyección, en este caso, de los axones talamocorticales

rostrales. Este tipo de mecanismos incrementan las posibilidades de respuesta de los axones frente una limitada cantidad de moléculas de guía axonal.

FLRT3 (Fibronectin Leucine-Rich Transmembrane protein) is one of the three members that compose a family of transmembrane proteins and it has been involved in different processes such as cell adhesion and neuron repulsion. In the moment when I started my thesis the functions that had been described for FLRTs involved non-cell autonomous mechanisms and there was no knowledge about the possible intracellular signalling mechanisms. Nevertheless, our hypothesis was that they do exist due to some studies that showed interaction between FLRT3 and Rnd or the phosphorylation of FLRT1 by FGFR1. In our study by the use of the two-hybrid technique and the following test in HEK293T cells and in primary thalamic neurons culture, we have found that FLRT3 interacts with Robo1, one of the four members of the Robo receptors family that has been involved in axon guidance and neuron migration processes, among other. Robo1 is the receptor for one of the best-characterized guidance molecules, Slit, and after its activation by Slit, it signals a repulsive response.

Our results in HEK293T cells show that FLRT3 and Robo1 interact *in cis* by their intracellular domains and that the Robo1 conserved domains, CC1, CC2 and CC3, are involved in this interaction. Moreover, we have seen that the co-expression of FLRT3 with Robo1 induces the cleavage of the receptor and we have found that FLRT3 interacts with the processed fragment, which contains the intracellular domain of Robo1, with higher affinity than with the full-length receptor and that FLRT3 keeps it in the plasma membrane. The interaction FLRT3-Robo1 seems to be constitutive given that it can not be modulated by the presence of the Robo1 ligand, Slit1. However, in the presence of its ligand Slit1 there is an increase in the cleavage of Robo1 and the intracellular fragment generated is caught by FLRT3. The same results were observed in primary thalamic cultures demonstrating that the recruitment of this processed fragment of Robo1 by FLRT3 is done in a more physiological context and thus, it is likely to be relevant for the Robo1 function. Moreover, as the Robo1 cleavage and the formation of its fragment, which contains the intracellular domain, have been involved in its intracellular signalling that generates a repulsive response, we suggest that FLRT3 is likely to inhibit this signalling process by keeping the processed fragment in the plasma membrane.

FLRT3 and Robo1 are co-expressed in rostral thalamocortical axons at E13.5 and we could demonstrate that both proteins also interact in primary thalamic cultures. The interaction happens in a moment in the development in which Robo1 has a key role in the projection of the thalamic axons towards the cerebral cortex and thus, this interaction suggest that FLRT3 could be involved in the regulation of this Robo1 function. In fact, in one study, in which we have collaborated with two more laboratories, we have seen that the interaction between FLRT3 and Robo1 is necessary for the correct projection of the thalamic axons towards the cerebral motor cortex. The signalling mechanisms involved in this processed re not well known, but one of the key steps is the increase of the DCC receptors in the plasma membrane of the growth cones in these axons that makes possible the attractive response to Netrin1. Our collaborators have seen that the PKA activity is involved in this increase of the DCC receptors in the membrane, but it is not the only signalling pathway involved given that we have seen that the ROCK activity is also necessary to produce this increase. Whether there is crosstalk between PKA signalling pathway and ROCK signalling pathway is still an important question to address in this System. Therefore, somehow, FLRT3 together with Robo1 in the membrane and ROCK and PKA, as intracellular signalling elements, are involved in the correct patterning of the rostral thalamocortical axons.

As a summary, in the context of the rostral thalamic neurons, our results point out that on the one hand, FLRT3 directly regulates in a negative way the Slit1/Robo1 repulsive signalling probably by keeping the processed fragment in the plasma membrane. And on the other hand, FLRT3 could be changing Robo1 signalling towards the activation of PKA and ROCK signalling pathways that subsequently promote an increase of the DCC receptors in the membrane and the attractive signalling induced by Netrin1. FLRT3 in this case, is the key to convert the repulsive signalling generated by Robo1 to allow the attraction of Netrin1 and it explains how molecules with opposite activities (Slit1, repulsive and Netrin1, attractive) can cooperate for the proper projection, in this case, of the rostral thalamocortical axons. These kind of mechanisms increase the response possibilities of the axons to a limited set of guidance molecules.

INTRODUCCIÓ

1. Desenvolupament del sistema nerviós

Durant el desenvolupament del sistema nerviós diversos processos altament regulats en el espai i en el temps tenen lloc per tal que aquest esdevingui funcional. En primer lloc es produeix la neurogènesi procés pel qual a partir de la proliferació i diferenciació dels progenitors neurals situats en el lumen dels ventricles es generen neurones, en segon lloc es produeix la migració d'aquestes neurones cap a la seva posició final que dependrà de les característiques intrínseques de cadascuna i del moment del seu naixement, gairebé al mateix temps es produeixen processos de creixement dendrític i guia axonal pels quals les neurones estenen els seus axons fins la zona del cervell on fan sinapsis connectant així les diverses regions cerebrals entre si, finalment es produeix l'establiment i l'estabilització de les sinapsis fet que permet la transmissió d'informació entre neurones localitzades en zones diferents.

En aquest treball ens hem centrat bàsicament en un dels aspectes que tenen lloc durant el desenvolupament del sistema nerviós, concretament hem estudiat els mecanismes de guia axonal que tenen lloc en els axons talamocorticals, axons que neixen el tàlem i que fan sinapsis en l'escorça cerebral.

1.1 Migració neuronal

És el cervell l'únic òrgan on els diversos tipus cel·lulars es generen en zones diferents a les que ocupen al final del procés de desenvolupament i aquesta posició final és específica per cada tipus cel·lular. Aquest fenomen s'ha estudiat en profunditat en l'escorça cerebral on les neurones migren llargues distàncies i sobrepassen a altres neurones abans d'establir-se a la seva posició final dintre d'una determinada capa d'una determinada columna radial [1]. La migració d'aquestes neurones pot ser de dos tipus en funció del seu lloc de naixement i de les seves característiques funcionals, les que neixen al llarg de les zones ventriculars del telencèfal dorsal són neurones de projecció que segueixen una migració radial cap a l'escorça cerebral i les que neixen al llarg de les zones ventriculars del telencèfal ventral són interneurones que segueixen una migració tangencial per arribar a l'escorça (**Figura1**) [2].

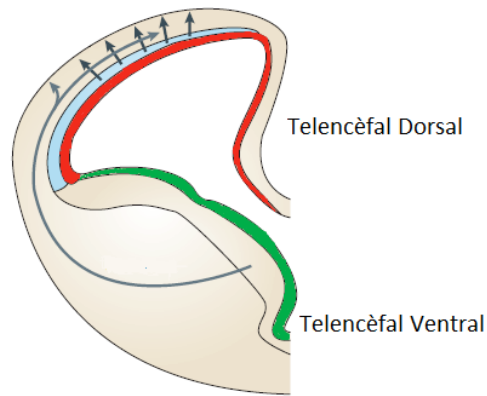


Figura 1 Esquema representatiu dels principals processos de migració que tenen lloc durant el desenvolupament de les neurones que majoritàriament formen l'escorça cerebral. A) Secció coronal de cervell de ratolí a estadi del desenvolupament E14 on es representa el procés de migració radial (fletxes negres) que té lloc en neurones nascudes en el telencèfal dorsal (roig) i el procés de migració tangencial (fletxes grises) que té lloc en neurones nascudes en el telencèfal ventral (verd). Adaptat de [3].

Abans, però, de que la migració d'aquestes neurones es produeixi, té lloc la seva generació en el procés anomenat neurogènesi. Les neurones de projecció, que segueixen una migració radial, es generen en la superfície apical dels ventricles a partir de cèl·lules neuroepiteliais indiferenciades. En primer lloc aquestes proliferen i augmenten en nombre al mateix temps que generen cèl·lules glia radials (RG) i que es forma la zona ventricular (VZ) [4]. En segon lloc les RG generen més progenitors, per un costat els progenitors intermedis (IP) i per l'altre les cèl·lules glia radials exteriors (oRG), i es forma la zona subventricular (SVZ) [5][6][7][8]. Les neurones de projecció es comencen a generar en el dia embrionari 10 (E10) i utilitzen el procés radial de les RG com a substrat per guiar la seva migració i formar així la preplaca (PP) [2]. Les neurones que es van generant posteriorment van migrant de la mateixa manera cap a la PP i la divideixen en dos capes, la zona marginal (MZ) i la subplaca (SP), establint entremig la placa cortical (CP) [9]. Després i durant la resta del procés de neurogènesi les neurones que es generen migren cap a la CP organitzant-se amb un patró "inside-out". Les primeres ocupen les capes més internes de la CP (capes VI i V) i les que neixen després migren i travessen la zona on estan les primeres i finalment s'estableixen en les capes més superficials de la CP (capes IV i II/III) (**Figura 2A**) [2]. Aquestes neurones es generen de forma seqüencial, per onades, on en cadascuna es genera un subtipus de

neurona de projecció: neurones de projecció corticotalàmiques, subcerebrals o callosa (**Figura 2B**), tot i que encara no es coneix a partir de quin llinatge es genera cadascun dels subtipus ni els mecanismes moleculars que determinen l'ordre [2].

Els progenitors neurals i les neurones que deriven d'ells formen unes columnes verticals de neurones germanes i cada subpoblació de neurones clonalment relacionada pateix una petita dispersió tangencial cap a les columnes veïnes [2][3].

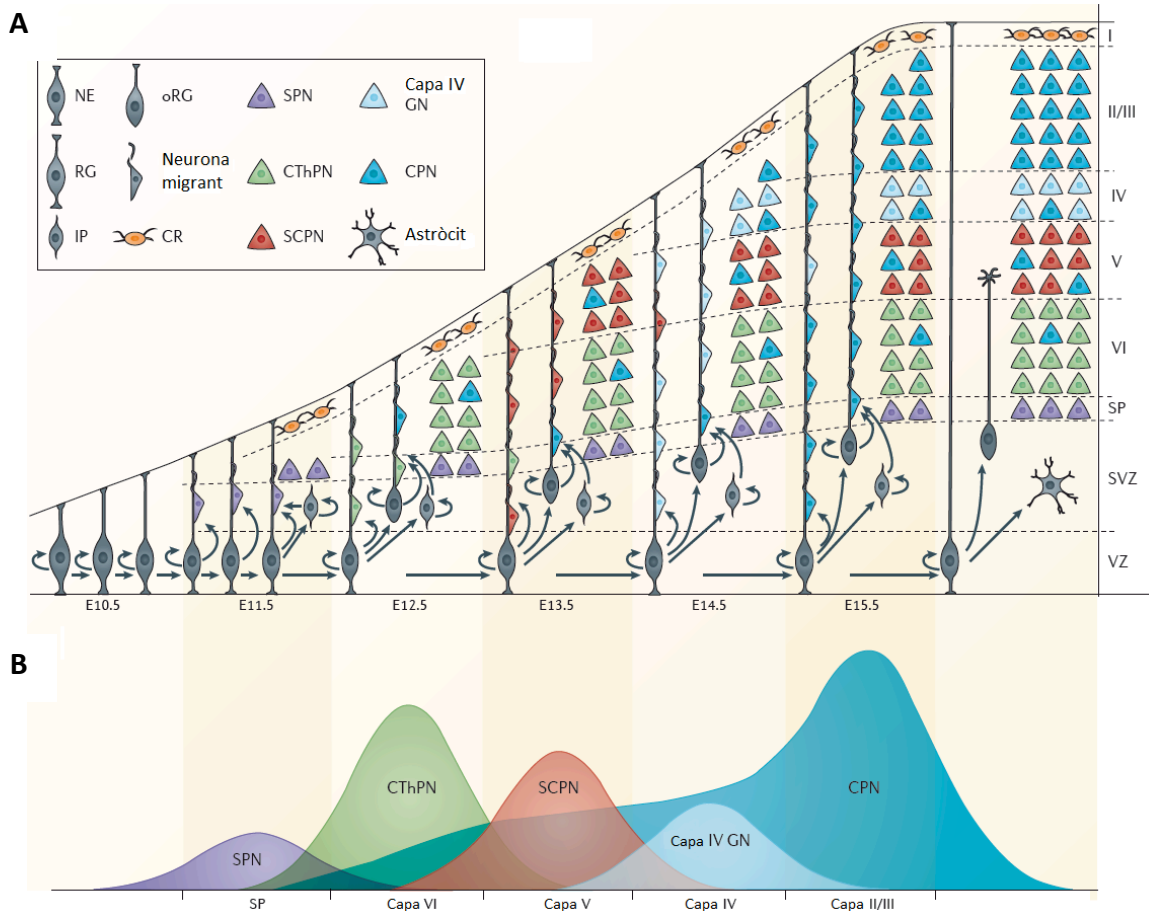


Figura 2 Representació del procés de migració radial durant el desenvolupament embrionari de les neurones de projecció a l'escorça de ratolí. A) Esquema dels precursors neurals i de com es generen cadascuna de les capes que formen l'escorça cerebral entre dia embrionari (E) 10.5 i E15.5. B) Onades seqüencials de generació dels diferents tipus de neurones de projecció. NE: cèl·lula neuroepitelial, RG: glia radial, IP: precursor intermedi, oRG: glia radial exterior, CR: Cajal-Retzius, SPN: neurones de la subplaca, CThPN: neurones de projecció corticotalàmiques, SCPN: neurones de projecció subcerebral, GN: neurones granulars, CPN: neurones de projecció callosa, E: dia embrionari, SP: subplaca, SVZ: zona subventricular i VZ: zona ventricular. Adaptat de [2].

Les interneurons, que segueixen una migració tangencial, es generen en diverses

regions del telencèfal ventral: aproximadament el 70% es genera en la superfície ventricular de la eminència ganglionar medial (MGE) [10][11], un 30% en la eminència ganglionar caudal (CGE) [12][13] i un petit percentatge en la eminència ganglionar lateral (LGE) i l'àrea anterior entopeduncular/àrea preòptica (AEP/PoA) **(Figura 3)** [14].

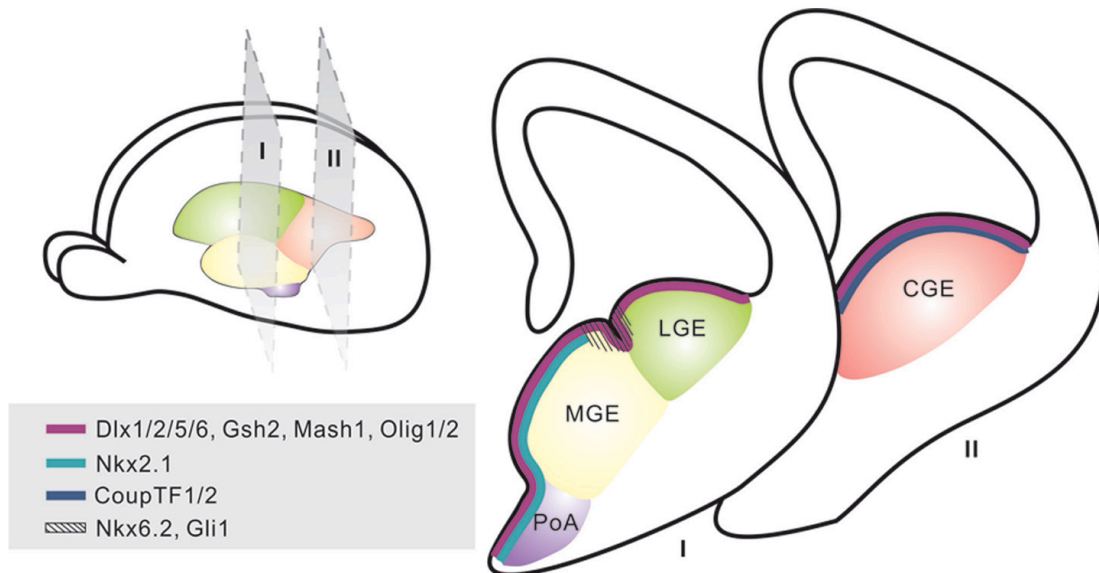


Figura 3 Zones del telencèfal ventral on es generen les interneurones corticals. I) Secció coronal intermèdia on es distingeixen tres de les zones que generen interneurones corticals. En verd la LGE, en groc la MGE i en violeta la PoA. II) Secció coronal caudal on es distingeix una de les zones que generen interneurones corticals. En rosa la CGE. A més a més es distingeixen amb diferents colors les zones on s'expressen els diversos factors de transcripció que tenen un paper fonamental en els processos de generació, diferenciació i migració de les interneurones corticals. En grana Dlx1/2/5/6, Gsh2, Mash1, Olig1/2; en blau clar Nkx2.1; en blau obscur CoupTF1/2 i ratllat Nkx6.2 i Gli1. PoA: àrea preòptica, MGE: eminència ganglionar medial, LGE: eminència ganglionar lateral i CGE: eminència ganglionar caudal. Adaptat de [15].

En la VZ d'aquestes regions hi ha un neuroepiteli indiferenciat a partir del qual es generen les cèl·lules progenitores RG. Aquests progenitors es divideixen en la superfície del ventricle i generen una nova cèl·lula RG i un IP que migra a la SVZ, es divideix i genera dues interneurones immadures. Durant el desenvolupament les neurones generades de forma progressiva van allunyant-se de la SVZ utilitzant les RG com a substrat al mateix temps que van adquirint la morfologia característica i les propietats biològiques de les interneurones gràcies al contacte amb les RG, i finalment migren tangencialment cap a l'escorça **(Figura 4)** [16].

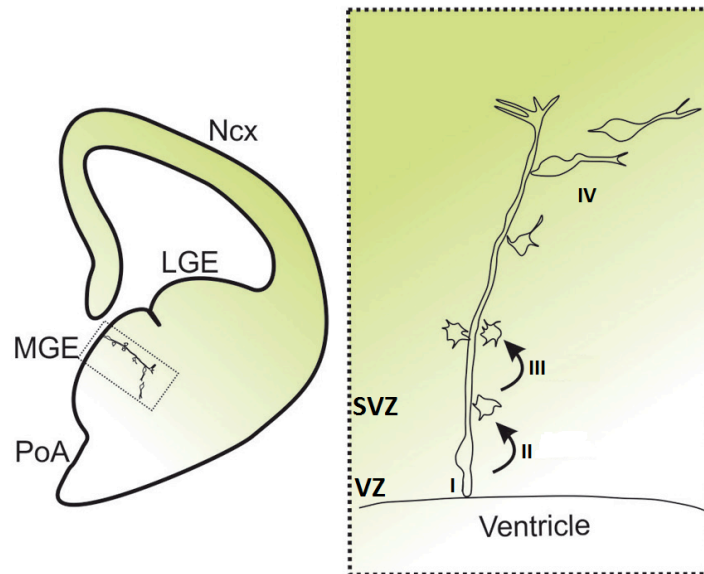


Figura 4 Generació d'interneurones corticals. Esquema representatiu de la generació d'interneurones en la superfície ventral del ventricle. I) Cèl·lula progenitora RG. II) Procés de divisió de la RG en què es genera un IP. III) Procés de divisió del IP en què es generen dues interneurones immadures. IV) Procés inicial de migració en què s'utilitza la RG per allunyar-se de la VZ al mateix temps que les interneurones van madurant. Ncx: escorça en desenvolupament, LGE: eminència ganglionar lateral, MGE: eminència ganglionar medial, PoA: àrea preòptica, VZ: zona ventricular i SVZ: zona subventricular. Adaptat de [15].

Per arribar a l'escorça les interneurones segueixen dues rutes tangencials diferents una és superficial i l'altra és interior. Les primeres interneurones que es generen, a partir de E11.5 en la MGE i en la AEP/PoA, segueixen una ruta superficial per arribar a l'escorça i un cop allí envaeixen la MZ i la SP [17][18][12]. Les interneurones que es generen entre E12.5 i E14.5 en la MGE, poden seguir la ruta superficial i acabar envaint la SP o la ruta interior que consisteix en passar a través d'una regió permissiva en la LGE per arribar a l'escorça i acabar envaint la regió entre la SVZ i la zona intermèdia (IZ) [17][18][10][12]. Les interneurones que es generen a partir de E14.5 en la MGE i en la LGE segueixen la ruta interior i envaeixen la regió entre la SVZ i la IZ [12]. Les interneurones que es generen en la CGE a partir de E12.5 migren en una direcció medial i lateral per arribar a l'escorça caudal (**Figura 5A**) [19][20]. La decisió de la ruta migratòria a seguir ve determinada per l'expressió combinatòria de diversos factors de transcripció dintre dels diferents dominis on estan els progenitors, és a dir, ve determinada pel lloc i el moment de naixement (**Figura 3**) [21][22][23][24][25][26][27].

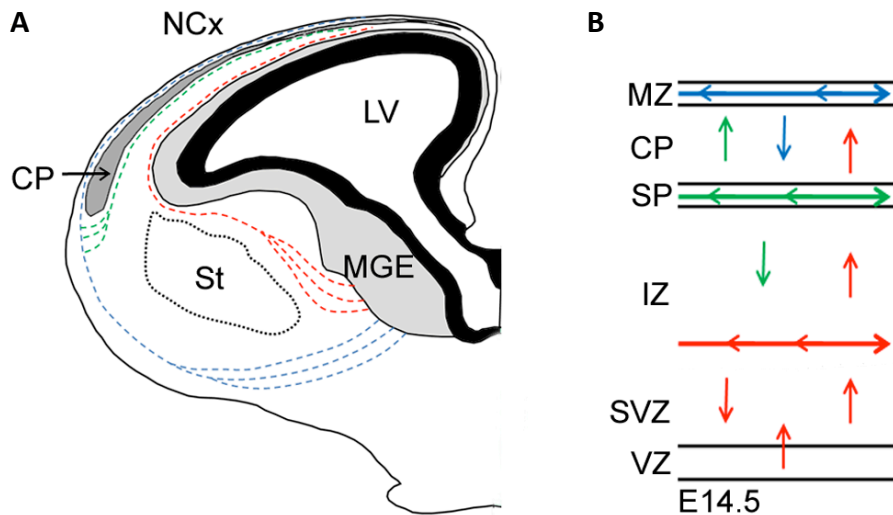


Figura 5 Rutes migratòries de les interneurons cap a l'escorça durant el desenvolupament embrionari del cervell de ratolí. A) En blau la ruta superficial, la primera en establir-se. Quan arriba a l'escorça cerebral es divideix en dos: blau per la que segueixen les interneurons que envaeixen la MZ i verd per la que segueixen les que envaeixen la SP. En vermell la ruta interior, la seguida principalment per les interneurons nascudes en etapes posteriors que envaeixen la regió entre la SVZ i la IZ. B) Amb fletxes horitzontals blaves, verdes i vermelles les regions corticals que envaeixen les interneurons, la MZ, la SP i la regió entre la SVZ i la IZ, respectivament. Amb fletxes verticals blaves, verdes i vermelles el procés de migració radial que experimenten a l'entrar en l'escorça independentment de la ruta amb la que arriben. Ncx: escorça en desenvolupament, LV: ventricle esquerre, MGE: eminència ganglionar medial, St: estriat, MZ: zona marginal, CP: placa cortical, SP: subplaca, IZ: zona intermèdia, SVZ: zona subventricular i VZ: zona ventricular. Adaptat de [28].

Aquestes neurones un cop arriben a l'escorça, independentment de la ruta escollida, migren a la VZ i allí reben senyals que els indiquen la capa cortical on s'han de situar [21]. El procés d'establiment en les diferents capes corticals segueix també un patró "inside-out", és a dir, les interneurons que neixen primer ocupen capes internes i les que neixen posteriorment ocupen capes superficials (**Figura 5B**) [29][30]. S'ha vist que les interneurons i les neurones de projecció que neixen en el mateix moment ocupen la mateixa posició en l'escorça fet que suggereix una certa coordinació entre ambdós processos [15]. A més a més, aquestes interneurons també utilitzen la glia radial per posicionar-se en l'escorça [31][32][20][33][34].

1.2 Guia axonal

La gran quantitat d'informació processada pel cervell ve determinada en certa manera per la xarxa de connexions que hi ha entre les neurones. En humans adults cadascuna del trilió de neurones fa connexió amb més de mil cèl·lules diana, en un circuit en què el patró precís és essencial pel correcte funcionament del sistema nerviós [35].

Les connexions neuronals es formen durant el desenvolupament embrionari quan cada neurona en diferenciació envia un axó que viatja a través de les diferents estructures embrionàries per arribar a la cèl·lula diana on farà sinapsis. Aquests axons viatgen durant llargues distàncies, sovint diversos centímetres. Aquesta tasca, anomenada "guia axonal" es veu simplificada per dos processos principals:

En primer lloc les trajectòries axonals semblen estar trencades en petits segments, cadascun d'un centenar de micròmetres de llarg. Cada segment de forma individual acaba en un grup de cèl·lules especialitzades que formen el que s'anomena diana intermèdia o punt de decisió i que tenen la funció de presentar informació als axons perquè aquests puguin seleccionar la direcció i començar el creixement d'un nou segment de la trajectòria.

Així doncs, el creixement axonal sembla estar caracteritzat per dos tipus de comportaments cel·lulars, en primer lloc un creixement simple i lineal i en segon lloc un comportament més complicat en què es prenen decisions complexes [35].

En segon lloc el procés de guia axonal es produeix per etapes, és a dir, no tots els axons creixen en el mateix moment ja que hi ha onades de creixement. Els primers axons (axons pioners) que es desenvolupen han de viatjar per un medi sense axons quan l'embrió és relativament petit i els que es desenvolupen en etapes posteriors viatgen sobre els tractes axonals (fascicles) preexistents canviant d'un a l'altre en determinats punts intermedis [35].

La manera com els axons exploren l'ambient per arribar a la cèl·lula diana és a través d'una estructura en l'extrem de l'axó, que té una gran mobilitat i una gran sensibilitat, que s'anomena el "con de creixement" i que pot arribar a mesurar cinquanta

micròmetres d'ample. Té dues estructures principals, els fil·lopodis i el lamel·lipodi. Els fil·lopodis són estructures que sobresurten del lamel·lipodi, que són molt dinàmiques, apareixen i desapareixen, i n'hi ha diverses en cada con de creixement. El lamel·lipodi és la part central. Si es fa una analogia amb la mà, aquesta seria el con de creixement, els dits serien els fil·lopodis i la palma de la mà seria el lamel·lipodi (**Figura 6**) [36][37]. Els canvis en la morfologia, la mobilitat i la direcció de creixement que pateix el con de creixement en un determinat moment, en resposta a substàncies de l'ambient, depenen dels canvis que es produeixen en l'organització del citoesquelet del con de creixement [38][39][40][41]. Aquest citoesquelet està format per filaments d'actina (F-actina) i per microtúbuls. Els F-actina apareixen de dues formes diferents, poden presentar-se com filaments densos i paral·lels que es troben en els fil·lopodis o com xarxes de filaments lliures entrelaçats en la part central del con de creixement o lamel·lipodi (**Figura 6**) [42]. Els filaments fil·lopodials estan orientats amb els extrems de polimerització ràpida d'actina cap a la punta del fil·lopodi fent que l'extensió i la retracció d'aquest reflecteixi el balanç entre la polimerització que es dona en l'extrem i flux retrògrad cap a l'interior del con de creixement [43][44][45]. Els fil·lopodis sovint creixen de forma asimètrica abans de que el con de creixement giri [46][47][48], no obstant la funció precisa dels fil·lopodis en el canvi de direcció que pot prendre el con de creixement no està ben definida tot i que s'ha postulat que dirigeixen el con permetjà d'adhesió diferencial, generant força mecànica o transduint senyals distals [49]. Els microtúbuls estan presents en forma de feixos estables en l'eix de l'axó. De forma individual alguns microtúbuls entren en el con de creixement, aquests presenten inestabilitat dinàmica i van allargant-se o retraient-se a mesura que exploren la perifèria del con de creixement [41]. Generalment, solen creixen al llarg dels F-actina fil·lopodials i la seva captura i estabilització per aquests filaments és un fet essencial i crític perquè el con de creixement pugui canviar la direcció de creixement (**Figura 6**) [41][50].

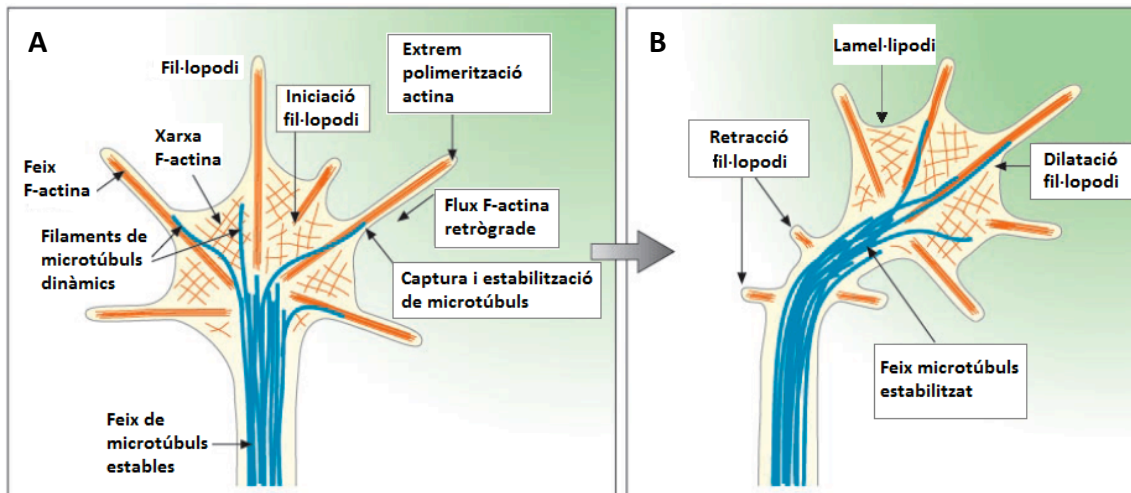


Figura 6 Estructura del citoesquelet del con de creixement. A) Con de creixement amb els principals components del citoesquelet que intervenen en el procés de guia axonal com són els feixos d'actina (F-actina) i els feixos de microtúbuls. Mostra una de les dues estructures que formen el con de creixement, els fil·lopodis. B) Con de creixement que gira cap al gradient de la molècula atractiva representada amb color verd. Mostra la segona de les dues estructures que formen el con de creixement, el lamel·lipodi. Adaptat de [36].

Aquests canvis en la direcció de creixement dels cons de creixement ve determinada per la presència de senyals en el medi que són capaces de desencadenar una resposta que pot ser d'atracció o de repulsió fet que fa que el con de creixement viatgi cap al lloc on es troba aquesta senyal o pel contrari l'eviti, respectivament. Hi ha quatre tipus de senyals que els cons de creixement es poden trobar: senyals de rang llarg que poden ser atractives o repulsives i senyals de rang curt que poden ser també atractives o repulsives, però sempre després del contacte amb una altra cèl·lula. En les primeres la resposta del con de creixement es dona quan percep la senyal que està difosa en el medi i en les segones quan la senyal es presenta en la superfície d'una altra cèl·lula i es requereix per tant el contacte (**Figura 7**) [51].

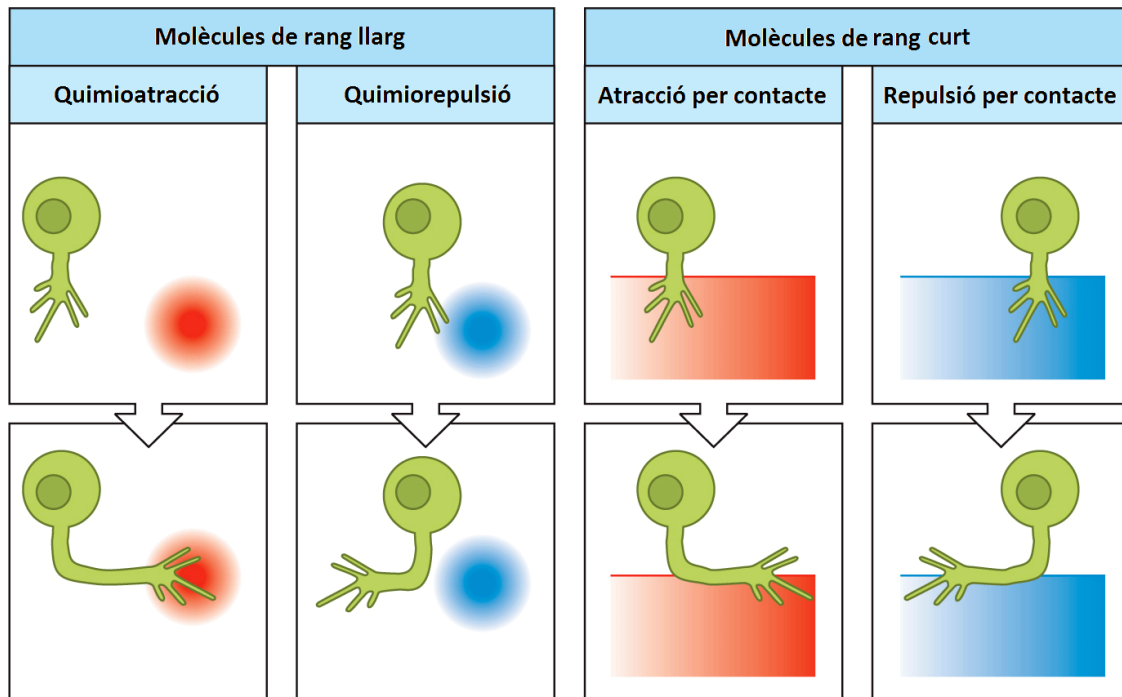


Figura 7 Tipus de respostes dels cons de creixement a senyals externes. Esquema on es representen les respostes que el con de creixement fa al detectar els diferents tipus de senyals. La quimioatracció i la quimiorepulsió són les respostes d'atracció i repulsió, respectivament, generades per molècules que actuen a rang llarg, és a dir, a distància. L'atracció i la repulsió per contacte es donen quan el con de creixement entra en una regió on està present una determinada molècula que és capaç de generar una resposta d'atracció o de repulsió, respectivament, en el con. Adaptat de Molecular & Developmental Biology (BIOL3530) with Dr. Brian E. Staveley

Fins ara es coneixen diverses molècules que tenen la capacitat d'originar aquestes respostes gràcies a la seva interacció amb receptors específics que es troben en el con de creixement. S'aprofundirà més en aquest tema en el punt 2.1 d'aquesta tesi.

1.3 Formació de sinapsis

La finalitat de que els axons viatgin durant llargues distàncies és l'establiment de sinapsis amb una cèl·lula diana. Les sinapsis són estructures que regulen la comunicació intercel·lular en el sistema nerviós i són les principals reguladores del flux d'informació en els circuits neurals. On, quan i com es formen determina la connectivitat i la funcionalitat d'aquests circuits. No obstant, el sistema nerviós madur pot encara adaptar-se a canvis en l'entorn per mitjà de canvis en la connectivitat sinàptica i en la força de transmissió, un fenomen conegut en general com a

“plasticitat sinàptica” [52].

La formació de sinapsis inclou una sèrie de canvis morfològics i estructurals coordinats que tenen lloc tant en la cèl·lula pre-sinàptica, que és la que envia el seu axó fins una cèl·lula diana, com en la cèl·lula post-sinàptica, que és la cèl·lula diana. En primer lloc el con de creixement arriba a la zona de la cèl·lula diana on s’ha de formar la sinapsis i inicia el procés de sinaptogènesi transformant-se en el que s’anomena especialització pre-sinàptica. En segon lloc s’estableix un contacte entre l’especialització pre-sinàptica i una immadura espina dendrítica de la cèl·lula diana per mitjà de molècules d’adhesió com membres de les superfamílies cadherina i immunoglobulina, integrines, receptors Eph, neurexines, proteïnes amb dominis LRR (Leucine-Rich Repeat) [53][54]. Aquestes espines dendrítiques post-sinàptiques són fil·lopodis primis rics en filaments d’actina que apareixen en la superfície de les dendrites per buscar al seu axó pre-sinàptic. Finalment es produeix l’estabilització i la maduració cap a una sinapsi funcional, fet que implica canvis en el citoesquelet, el reclutament de proteïnes i components en el lloc de contacte, tant pre- com post-sinàptic, i l’expansió del cap de l’espina dendrítica (Figura 8) [55][56].

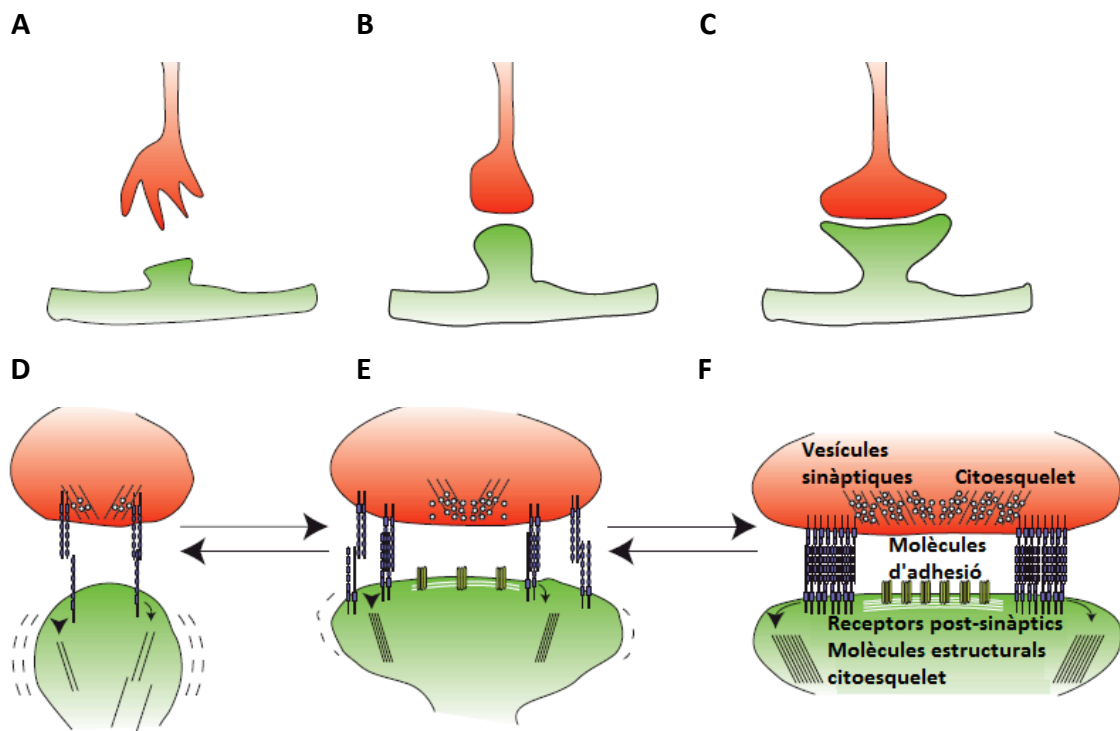


Figura 8 Procés de formació d'una sinapsi. A) Arribada del con de creixement axonal a la cèl·lula diana.

B) Establiment de contacte entre els compartiments pre- i post-sinàptics. C) Estabilització i maduració de la sinapsi. D, E i F) Mostren esquemàticament el procés d'establiment de contacte i maduració de la sinapsi fent èmfasi en les molècules d'adhesió i la reorganització del citoesquelet. Les molècules d'adhesió que intervenen són membres de la superfamília de les cadherines i de les immunoglobulines, integrines, receptors Eph, neurexines i proteïnes amb domini LRR (Leucine-Rich Repeat). Els receptors post-sinàptics són els receptors dels diferents neurotransmissors (ex. AMPAR, NMDAR). Adaptat de [55].

Tanmateix, les sinapsis es poden perdre quan hi ha una retracció en la zona de contacte sent així el procés de formació de sinapsis molt plàstic. A més a més, a part d'aquesta plasticitat, la gran heterogeneïtat de sinapsis que es poden generar fa que la sinaptogènesi sigui un procés molt complex [57].

Un cop la sinapsi està formada i és funcional es produeix el que s'anomena transmissió sinàptica que és el procés pel qual els senyals elèctrics es transporten entre una neurona i la seva cèl·lula diana. Per la majoria de neurones un potencial d'acció en l'axó pre-sinàptic estimula l'alliberació controlada de neurotransmissors químics que s'uneixen i activen determinades proteïnes receptores que es troben en les membranes pre- i post-sinàptiques. Això provoca l'obertura de canals iònics i l'activació de diferents cascades de senyalització. D'aquesta manera és com la cèl·lula pre-sinàptica es comunica i transmet la informació a la cèl·lula post-sinàptica o cèl·lula diana [56].

2. Mecanismes moleculars de guia axonal

Les neurones en l'extrem de l'axó tenen una estructura anomenada con de creixement que s'encarrega de captar els gradients de les molècules de guia que es troben al llarg del seu camí fins arribar a la cèl·lula diana. Aquestes molècules poden ser atractives o repulsives i actuen per mitjà de receptors específics els quals desencadenen una senyalització intracel·lular que acaba fent canvis en la dinàmica del citoesquelet i això permet que es produeixi la resposta corresponent. Aquesta senyalització està regulada per diversos mecanismes, fins l'actualitat s'han descrit processos com traducció local de proteïnes en el con de creixement, l'activitat de segons missatgers, l'activitat de RhoGTPases, processos d'endocitosi i d'exocitosi de receptors i processament de receptors. Aquests mecanismes juntament amb la integració de diverses molècules

guia en el mateix moment per un únic con de creixement és el que permet que un grup tant petit de molècules pugui ésser capaç de promoure tantes respostes diferents i pugui generar totes les connexions que existeixen en el sistema nerviós.

2.1 Molècules de guia axonal i els seus receptors

Per tal de formar un sistema nerviós funcional, les neurones estenen els seus axons, sovint durant llargues distàncies, per arribar a la seva diana. Aquest procés està controlat per receptors i els seus lligands, aquests últims poden actuar atraient o repel·lint els cons de creixement on s'expressen els seus receptors i un determinat receptor, generalment, pot transduir qualsevol de les respostes depenent del context cel·lular. Els receptors del con de creixement no actuen sols, sinó que poden combinar-se amb altres de la mateixa família o d'un altra per tal de produir la resposta [58].

En els darrers anys de la dècada dels vuitanta i els primers de la dècada dels noranta una sèrie d'assajos genètics i bioquímics van permetre la identificació de proteïnes que actuaven de manera instructiva atraient o repel·lint axons. Fins aleshores només s'havien identificat molècules que generalment actuaven d'una forma permissiva proveint un substrat sobre el què els axons podien créixer i no induint activament un canvi en la direcció de creixement del cons de creixement [58].

Actualment hi ha quatre famílies de lligands amb els seus receptors molt ben caracteritzats: Slits, Netrins, Efrines i Semaforines. No obstant, altres classes de molècules conegudes en contexts diferents també són reconegudes com a molècules de guia, aquestes són morfògens, esteroides, molècules de la matriu extracel·lular i d'adhesió i membres de les superfamílies de les immunoglobulines. La identificació i caracterització d'aquestes molècules i els seus receptors han permès establir diverses generalitzacions importants sobre els mecanismes de guia com per exemple l'existència de molècules que actuen a rang curt i/o rang llarg, la natura multifuncional d'algunes d'aquestes molècules, la conservació evolutiva de totes elles i els papers que tenen en els processos de guia axonal [51][36][59][51][60].

2.1.1 Slit i els receptors Robo

Les molècules de guia axonal Slit són glicoproteïnes grans secretades que senyalitzen per mitjà dels receptors Roundabout (Robo). Robo va ser identificat per primera vegada en un estudi genètic per trobar gens implicats en el control del creuament de la línia mitja pels axons comissurals en *Drosophila melanogaster* [61]. De forma similar, posteriorment, es va identificar Slit com a proteïna secretada per cèl·lules de la línia mitja [62][63]. Aquests estudis suggerien que Robo era el receptor d'una molècula repulsiva de la línia mitja, Slit. Aquesta funció repulsiva de Slit es va trobar conservada en vertebrats, tot i que en altres estudis es va veure que Slit podia estimular la formació i l'elongació de ramificacions axonals sent així molècules multifuncionals [64][65][66].

Les molècules de guia Slit són els lligands principals dels receptors Robo. Van ser descoberts originàriament en *D. melanogaster* i des de llavors homòlegs s'han identificat en diverses espècies [63][64][65]. En *D. melanogaster* i *Caenorhabditis elegans* es troba un membre i en vertebrats tres membres (Slit1, Slit2 i Slit3) [67][64]. Aquests tres membres, en mamífers, s'expressen en el sistema nerviós i també en la majoria d'òrgans [68]. Aquestes glicoproteïnes secretades tenen la següent estructura: un pèptid senyal en la part N-terminal, quatre dominis (D1, D2, D3 i D4) que contenen repeticions riques en leucina (LRR), diverses seqüències EGF-like, un domini laminina G i una part rica en cisteïna en la regió N-terminal (**Figura 9**) [69][66][70]. Són molècules d'uns aproximadament 200kDa que poden ser processats i generar un fragment aminoterminal d'uns 140kDa que és el que s'uneix als receptors Robo i un fragment petit C-terminal del que no es sap la funció [70]. No obstant, les molècules Slit no sempre s'uneixen a Robo, sinó que s'ha descrit que poden unir-se a proteoglicans heparan sulfat (HSPG) fet que potencia la seva activitat [71]. A més a més, s'ha vist que poden tenir "splicing" alternatiu en humans i ratolins, fet que implica la possibilitat de que múltiples isoformes puguin existir. Alguns estudis han mostrat que hi ha un "splicing" alternatiu del mRNA de Slit1 trobat específicament en el sistema nerviós de vertebrats anomenat Slit1 α . Aquest fet suggereix que podria tenir un paper fonamental en el desenvolupament del sistema nerviós [72][73].

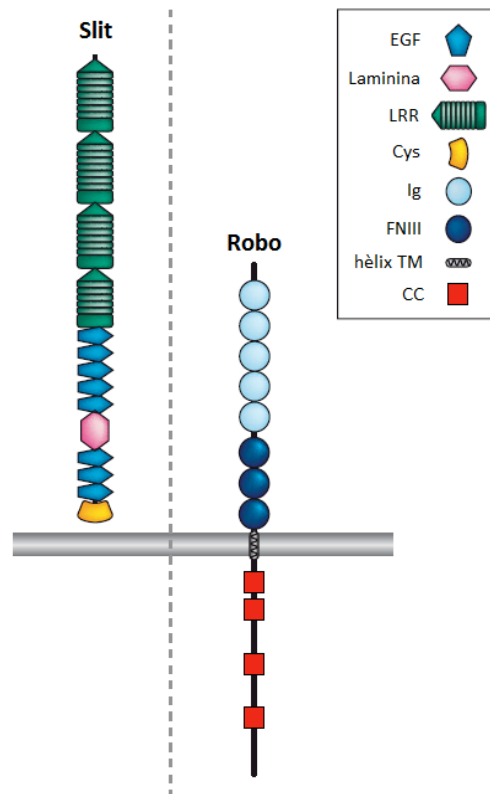


Figura 9 Estructura dels lligands Slit i els receptors Robo (1-3). Les molècules de guia Slit s'uneixen als receptors Robo per senyalitzar, concretament en *D. melanogaster* s'ha caracteritzat que el segon domini LRR (D2) de Slit s'uneix al primer i segon domini Ig (Ig1 i Ig2) de Robo. EGF: factor de creixement epidèrmic, LRR: regió rica en leucina, Cys: regió rica en cisteïna, Ig: domini immunoglobulina, FNIII: domini fibronectina de tipus tres, hèlix TM: hèlix transmembrana i CC: domini citoplasmàtic conservat. Adaptat de [51].

La família de proteïnes transmembrana Robo pertanyen a la superfamília d'immunoglobulines (Ig) de les molècules d'adhesió cel·lular (CAM) i també estan conservades entre espècies [74]. En *D. melanogaster* existeixen tres Robos (Robo1, Robo2 i Robo3), en *C. elegans* un (SAX3) i en mamífers n'hi ha quatre (Robo1, Robo2, Robo3 i Robo4) tot i que Robo4 és més divergent [51]. En la majoria de vertebrats hi ha tres Robos expressats en cervell (Robo1-3) i Robo4 s'expressa en cèl·lules endotelials i participa en l'angiogènesi [75][76]. El receptor Robo, en la seva regió extracel·lular, conté cinc repeticions Ig-like seguides per tres repeticions de fibronectina de tipus tres (FNIII) i en la regió intracel·lular té quatre dominis citoplasmàtics conservats (CC0, CC1, CC2 i CC3) (**Figura 9**). Tots els receptors Robo poden tenir "splicing" alternatiu i es generen diverses isoformes. Si hi ha "splicing" alternatiu en la regió 5' de la seqüència

codificant es poden generar dues isoformes del receptor, A i B, que es diferencien en la part N-terminal. Les isoformes del tipus A són més grans (15-40 residus) que les del tipus B [77][78]. En el cas de Robo3, "l'splicing" alternatiu d'un intró en la regió 3' de la seqüència genera dues isoformes que difereixen en la seva part C-terminal, sent Robo3.1 més gran que Robo3.2 i funcionant com inhibidor de l'efecte repulsiu en què intervenen Robo1 i Robo2 en la línia mitja [79].

Les funcions que s'han descrit fins ara són regulació de processos de migració cel·lular, guia axonal i adhesió cel·lular.

2.1.2 *Netrines i els receptors DCC i Unc5*

Les Netrines són una família petita de molècules, la majoria secretades, d'uns 60-80kDa filogenèticament conservades que van ser descobertes originàriament en vertebrats quan es buscava una molècula quimioattractiva que s'expressava en el "floor plate" i que atreïa els axons comissurals cap a la línia mitja i també per l'anàlisi de gens en *C. elegans* requerits per la guia axonal circumferencial [80]. Al llarg de l'evolució, les molècules Netrin, una de les funcions que han tingut ha set la d'atreure els axons ventralment cap a la línia mitja [81]. No obstant, també poden tenir un efecte de repulsió en alguns axons, i aquesta funció també ha estat conservada [82][83][84]. És a dir, tenen papers multifuncionals en guia axonal, ja que poden actuar depenent de context com atractives o repulsives. A més a més, també intervenen en altres processos com per exemple la migració cel·lular. Aquestes molècules poden actuar a rang llarg difonent des de la seva font un centenars de micròmetres i també a rang curt quan són immobilitzades en les cèl·lules que les produeixen [85][86].

Existeix un gen que codifica per Netrin en *C. elegans* (UNC-6), dos en *D. melanogaster* (NetrinA i NetrinB), dos en zebrafish i pollastre (Netrin1 i Netrin2) i quatre en mamífers (Netrin1, Netrin3 o NTL2, Netrin4 o Netrin β i NetrinG) [80]. Les molècules Netrin1, Netrin2, Netrin3 i NetrinG comparteixen homologia amb les cadenes γ de la laminina, mentre que Netrin4 mostra més homologia a les cadenes β de la laminina [51][80][87]. L'estructura secundària de la família està altament conservada en totes les espècies. En la part aminoterminal aquestes proteïnes presenten un pèptid senyal, un domini

homòleg a un domini de la laminina i tres dominis anomenats V1, V2 i V3 que són repeticions EGF trobades en la regió V de les cadenes de la laminina. La part C-terminal és la que varia més entre espècies. S'anomena domini C o NTR i està relacionada amb un domini trobat en Frizzled i en algunes proteïnes del complement, és una seqüència rica en aminoàcids bàsics que actuen com a llocs d'unió a heparina, proteoglicans heparan sulfat o glicolípid de membrana, permetent la interacció amb components de la matriu extracel·lular o superfície cel·lular (**Figura 10**) [80].

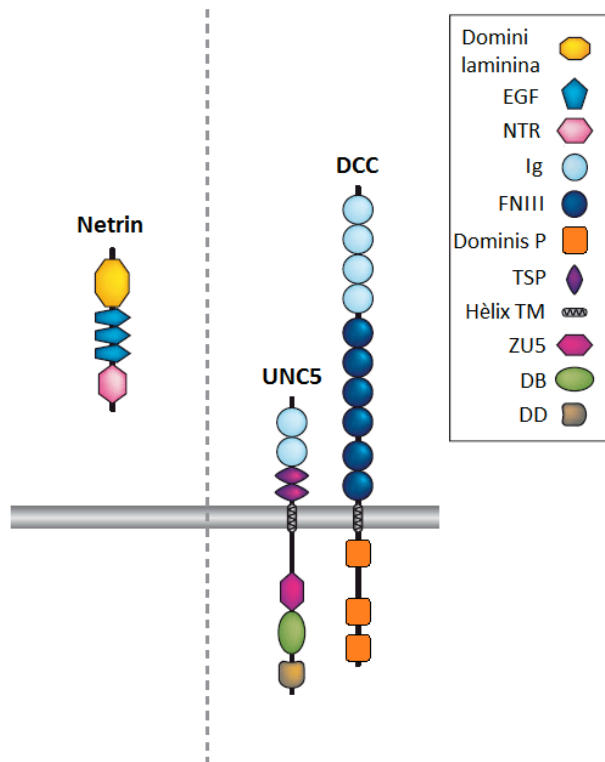


Figura 10 Estructura dels lligands Netrin i els receptors DCC i Unc5. Dos dels receptors descrits de les molècules Netrin són DCC i Unc5. DCC està implicat en respostes d'atracció, però si interacciona amb el domini citoplasmàtic de Unc5 intervé en respostes de repulsió. Unc5 sempre senyalitza repulsió, bé sol o amb la interacció de DCC. EGF: factor de creixement epidèrmic, NTR: domini C-terminal, Ig: immunoglobulina, FNIII: domini fibronectina tipus tres, TSP: domini trombospondina tipus un, Hèlix TM: hèlix transmembrana, DB: domini unió a DCC i DD: domini de mort. Adaptat de [51].

En totes les espècies els efectes atractius de Netrines són mediat per receptors de la família DCC (delecionat en càncer colo-rectal). Es troba a UNC-40 en *C. elegans*, a Frazzled en *D. melanogaster* i a DCC i Neogenina en vertebrats [88][89][90]. DCC i Neogenin són receptors transmembrana de tipus I que comparteixen similitud de

seqüència amb molècules d'adhesió cel·lular (NCAM) [90]. Contenen quatre dominis immunoglobulina (Ig), sis repeticions fibronectina de tipus tres (FNIII) i la regió citoplasmàtica d'aquests receptors conté tres regions de gran homologia entre les diferents espècies anomenats P1, P2 i P3 (**Figura 10**) [89][91]. Netrin s'uneix directament a DCC, concretament a la cinquena repetició FNIII [92]. S'ha descrit que en alguns sistemes els receptors de l'adenosina A2b podrien actuar com a co-receptors ajudant a induir atracció [93]. També s'ha proposat que la molècula d'adhesió cel·lular del síndrome de Down (DSCAM) funciona com a co-receptor en casos on Netrin està implicada en atracció [94][95].

Els efectes repulsius de Netrines són mediatos per membres de la família Unc5. Es troba a UNC-5 en *C. elegans* i en *D. melanogaster* i a quatre membres en mamífers, en rosegadors anomenats UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 i UNC5H4 i en humans anomenats UNC5A, UNC5B, UNC5C i UNC5D [96][51]. La seva part extracel·lular conté dos dominis immunoglobulina (Ig) i dos dominis trombospondina de tipus I (TSP). La part citoplasmàtica conté tres regions conservades: un domini ZU5, un domini d'unió a DCC (DB) i un domini de mort (DD) (**Figura 10**) [91][92][97]. La regió d'unió de Netrin a Unc5 és el domini Ig del receptor [92].

Els receptors DCC poden estar implicats en respostes d'atracció i de repulsió, mentre que els receptors Unc5 només en repulsió actuant sols o amb DCC. Sembla ser que els receptors Unc5 requereixen a DCC per intervenir en respostes de repulsió on la concentració de lligand és baixa, en aquestes situacions es produeix la interacció entre el domini citoplasmàtic P1 de DCC i el domini CB d'Unc5 [91][98][84].

En alguns sistemes s'han identificat altres receptors de Netrines, com és el cas de les integrines $\alpha 6\beta 4$ i $\alpha 3\beta 1$ [99].

2.1.3 Efrines i els receptors Eph

Les Efrines són els lligands dels receptors tirosina quinasa Eph. Aquesta família es va descobrir per primera vegada quan es buscava unes molècules expressades en forma de gradient en la retina i el tèctum que estaven implicades en la localització topogràfica dels axons de la retina en el tèctum [100]. Aquestes molècules controlen

processos de guia axonal en diverses posicions, generalment actuen repel·lint, però en alguns casos s'ha descrit que també poden promoure atracció/adhesió. També són reguladors de ramificació axonal [51][59].

Tant els lligands com els receptors es divideixen en dues classes, la A i la B. Les Efrines A (EfrinaA1-EfrinaA5) estan ancorades a la membrana mitjançant un glicosilfosfatidilinositol (GPI) i s'uneixen als receptors EphA (EphA1-EphA8), mentre que les Efrines B (EfrinaB1-EfrinaB3) estan ancorades a la membrana per mitjà d'un domini transmembrana i s'uneixen als receptors EphB (EphB1-EphB4 i EphB6) [101][102][103]. Una excepció és EphA4 que pot unir membres d'ambdues classes. El fet de que ambdós tipus d'Efrines estiguin ancorades a la membrana indica que només funcionen a rang curt, és a dir, ha d'haver-hi una interacció cèl·lula-cèl·lula perquè es pugui desencadenar una resposta. A més a més, s'ha descrit que perquè puguin activar els seus receptors han d'agrupar-se. En mamífers existeixen vuit Efrines, en *C. elegans* quatre Efrines i en *D. melanogaster* una [36][104][105].

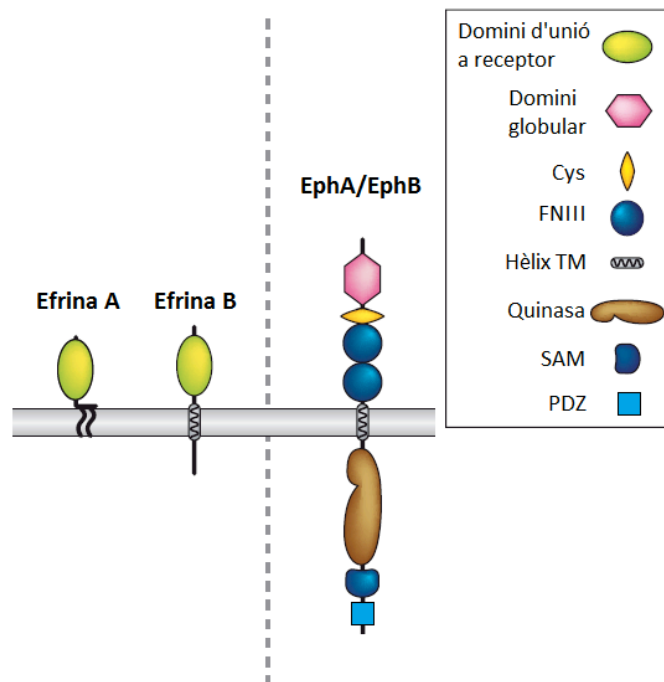


Figura 11 Estructura dels lligands Efrina i els receptors Eph. Tant les Efrines com els seus receptors Eph es divideixen en dos tipus, A i B. Les Efrines de tipus A s'uneixen als receptors EphA i les Efrines de tipus B als receptors EphB. A excepció del receptor EphA4 que pot unir Efrines del tipus A i del tipus B. Cys: regió rica en cisteïna, FNIII: domini fibronectina tipus tres, Hèlix TM: hèlix transmembrana, SAM: motiu

α estèril i PDZ: motiu d'unió de proteïnes. Adaptat de [51].

En mamífers hi ha tretze receptors Eph, en *C. elegans* un i en *D. melanogaster* també un [36][106][107]. La part extracel·lular dels receptors conté un domini d'unió a lligand, una regió rica en cisteïna i dues repeticions de fibronectina de tipus tres. La regió citoplasmàtica està dividida en quatre unitats funcionals: un domini jxtamembrana que conté dos residus tirosina conservats, un domini tirosina quinasa, un motiu α estèril (SAM) i un domini d'unió PDZ (**Figura 11**) [60][103].

Curiosament els receptors Eph també poden actuar com a lligands a l'igual que les Efrines poden actuar com a receptors. És a dir, en el sistema Efrina-Eph quan els receptors Eph actuen com a lligand i els lligands Efrina com a receptors té lloc el que s'anomena senyalització inversa. En canvi si els receptors Eph actuen com a receptors i els lligands Efrina com a lligands llavors té lloc el que s'anomena senyalització directa [108].

El sistema Efrina-Eph regula diverses funcions com la guia axonal, la plasticitat sinàptica, la migració neuronal, la morfologia cel·lular i altres funcions no neuronals com les interaccions cèl·lula-cèl·lula o el desenvolupament vascular entre altres. També s'han relacionat amb processos tumorogènics [59][51].

2.1.4 Semaforines i els seus receptors

Les Semaforines són una gran família de molècules de guia axonal filogenèticament conservades que poden trobar-se en la membrana o ésser secretades al medi [109]. Van ser identificades per primer cop quan es buscaven molècules que s'expressessin en uns determinats fascicles axonals del sistema nerviós de llagosta i per la purificació d'un potent inductor de col·lapse del con de creixement en vertebrats. Existeixen aproximadament vint Semaforines diferents en vertebrats superiors i poden actuar a rang curt o rang llarg generalment com a molècules repulsives. Tot i que també poden actuar com a molècules atractives, inclús una mateixa Semaforina pot tenir ambdues capacitats, depenent del context [51][109][110].

Les Semaforines es divideixen en vuit classes en base a la seva estructura. Les de classe

1 i 2 es troben en invertebrats, les de classe 3-7 es troben en vertebrats i les de classe 8 (SemaV) són codificades per virus. Les Semaforines de classe 2 (Sema2), les de classe 3 (Sema3) i les de classe 8 (SemaV) són secretades al medi; les Semaforines de classe 1, (Sema1), les de classe 4 (Sema4), les de classe 5 (Sema5) i les de classe 6 (Sema6) són proteïnes transmembrana; i les de classe 7 (Sema7) estan ancorades a la membrana mitjançant GPI [111]. Totes les Semaforines estan definides per la presència d'un domini Sema d'uns 420 aminoàcids conservat en la part N-terminal de la proteïna que té un paper fonamental en la unió amb els seus receptors i per un domini PSI (domini Plexina/Semaforina/Integrina) (**Figura 12**). A més a més, les Semaforines de classe 3 i 4 tenen una repetició Ig i les de classe 5 tenen set repeticions TSP (**Figura 12**). Sorprenentment s'ha vist que les Semaforines transmembrana tenen la capacitat de funcionar com a receptors en diversos exemples en *D. melanogaster*, pollastre i mamífers. Fet que obre la possibilitat de que es produeixi una senyalització directa o inversa [112].

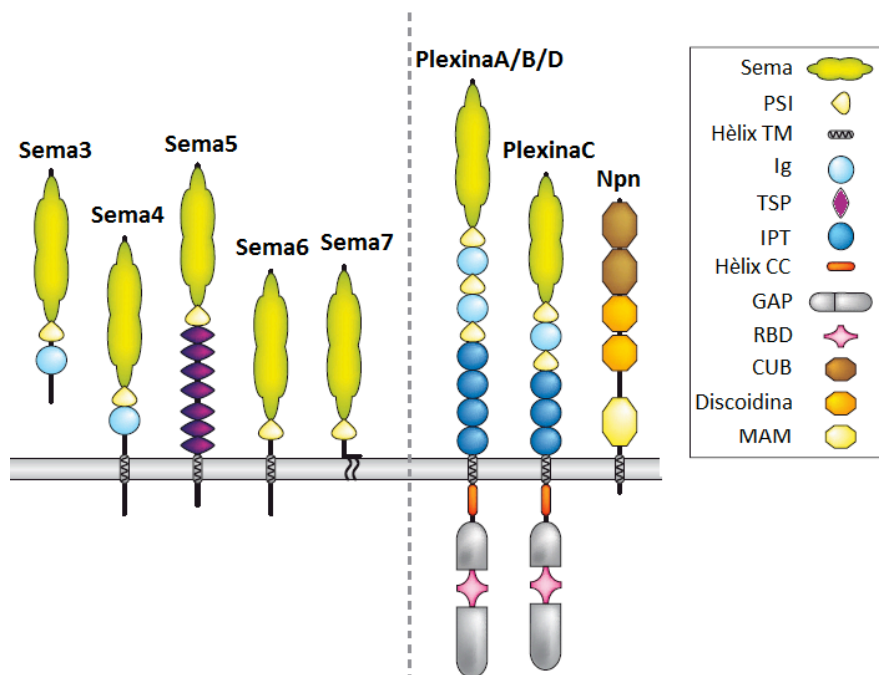


Figura 12 Estructura dels lligands Semaforina de vertebrats i els receptors Plexina i Neuropilina. En vertebrats existeixen cinc classes de Semaforines: Sema3 que són proteïnes secretades al medi extracel·lular, Sema4-Sema6 que són proteïnes amb un domini transmembrana i Sema7 que està ancorada a la membrana mitjançant GPI. Totes elles contenen un domini conservat Sema i un domini PSI. Els receptors Plexina es divideixen en quatre classes PlexinaA-PlexinaD, totes elles comparteixen els

mateixos dominis tot i que Plexina C és una proteïna més petita. Els receptors Neuropilina (Npn) també formen part del complex de receptors de membrana que estan implicats en la senyalització de Semaforines. PSI: domini Plexina/Semaforina/Integrina, Hèlix TM: hèlix transmembrana, Ig: Immunoglobulina, TSP: domini trombospondina tipus un, IPT: domini Ig/Plexina/Factors transcripció, GAP: domini activador GTPasa, RBD: domini d'unió RhoGTPasa i MAM: domini Meprin/proteïna A-5/receptor tirosina fosfatasa mu. Adaptat de [51].

Les Semaforines senyalitzen per mitjà de complexos de receptors, la composició dels quals no es coneix amb gran certesa. Hi ha dues famílies principals que es coneix que estan implicades en les respostes a Semaforines, els receptors Neuropilina (Npn1 i Npn2) i els receptors Plexina (PlexinaA1-PlexinaA4, PlexinaB1-PlexinaB3, PlexinaC1 i PlexinaD1) [113][114][115][116][117]. Totes les Semaforines s'uneixen a complexos de receptors que contenen Plexines, les quals funcionen com subunitats de transducció de senyal. Les Semaforines poden unir-se directament a Plexines o en el cas de la classe 3 unir-se a Neuropilines que actuen com a co-receptors. Tot i que les Semaforines secretades de classe 3 utilitzen els receptors Neuropilina com a co-receptors, el complex de senyalització també inclou Plexina [118]. Les diferents Semaforines secretades necessiten combinacions específiques de Npn1 o Npn2 i les diferents Plexines per desencadenar una determinada resposta de guia [112]. Els receptors Npn contenen en la seva part extracel·lular dues repeticions del domini CUB, dues repeticions del domini discoidina i un domini MAM (Meprin/proteïna A-5/receptor tirosina fosfatasa mu) i tenen una cua citoplasmàtica petita (**Figura 12**) [51]. Les Plexines són una gran família de proteïnes transmembrana filogenèticament conservades que es divideixen en quatre grups (PlexinaA-PlexinaD) en base a la similitud de seqüència. Les Plexines de classe A, B i D poseixen un domini Sema, tres repeticions PSI, dos repeticions Ig, quatre repeticions IPT (domini Ig/Plexina/Factors Transcripció), una hèlix CC, un domini GAP (proteïna activadora de GTPasa) i un domini RBD (domini d'unió RhoGTPasa). En canvi les Plexines de classe C posseeixen dos dominis PSI, un domini Ig i tres dominis IPT (**Figura 12**) [51]. Altres components essencials dels complexos de receptors inclouen la molècula d'adhesió cel·lular L1 (per Sema3a), el receptor tirosina quinasa Met (per Sema4d) i el receptor tirosina quinasa catalíticament inactiu OTK (per Sema1a en *D.melanogaster*) [119][36].

A part d'estar implicades en la regulació de la guia axonal, també intervenen en altres funcions durant el desenvolupament del sistema nerviós com per exemple especificació dendrítica, classificació axonal i especificitat sinàptica [111].

2.1.5 *Altres molècules de guia axonal: Morfògens, Factors de Creixement i Molècules d'adhesió*

Mentre que els estudis dels anys 1990 van permetre identificar Slits, Netrines, Efrines i Semaforines com a principals reguladors dels mecanismes d'atracció i de repulsió axonal, estudis paral·lels van implicar altres molècules en la guia axonal. Aquests són els morfògens (Wnt, Hedgehog -Hh-, TGFb/BMP), factors de creixement i també molècules d'adhesió.

Entre els morfògens, els Wnt són els que tenen més funcions de guia axonal associades. Estudis inicials mostraven un paper repulsiu dels Wnts en *D. melanogaster* i un paper atractiu en mamífers. Per exemple, el Wnt5 de *D. melanogaster* actuant a través de Derailed, proteïna homòloga al receptor tirosina quinasa Ryc, és repulsiu pels axons en la comissura posterior, mentre que en mamífers un gradient de Wnt4 decreixent d'anterior a posterior es va implicar en l'atracció dels axons comissurals espinals cap a una direcció anterior després de creuar la línia mitja a través del receptor de Wnt, Frizzled3 [120]. Des de llavors, diverses funcions s'han descrit pels diferents Wnts d'atracció i de repulsió axonal en diferents contextos neuronals i organismes; guiant migracions neuronals, dirigint el mapa topogràfic en el sistema visual de vertebrats i regulant la formació de sinapsis [121]. També s'han descrit funcions de guia per Sonic hedgehog (Shh) en vertebrats, entre elles és repulsiu per un subpoblació de cèl·lules ganglionars de la retina [122] i és atractiu pels axons comissurals espinals [123]. En tots dos casos, les funcions de guia impliquen un complex constituït per BOC (proteïna que s'uneix a Shh), un membre de la superfamília d'Ig i Smoothened (component de senyalització de Shh) [124][125]. Els membres de la família TGFb/BMP s'han descrit com a repulsius pels axons comissurals espinals, repel·lint-los de la línia mitja dorsal mitjançant l'activació de receptors canònics de BMP [126][127]. En *C. elegans*, el gen UNC-129 codifica per un membre divergent de la família TGF- β i és necessari per la guia dels axons motors dorsals [128], però no

actua directament com a molècula de guia axonal, sinó que modula la resposta dels axons cap a Netrin mitjançant la interacció directa amb el receptor UNC-5 [129].

Diversos factors de creixement s'han associat a processos d'atracció de poblacions d'axons específiques en el sistema nerviós de vertebrats. Aquests són, factor de creixement d'hepatòcits, factor neurotròfic i neurotrofina3, factors de creixement de fibroblasts, neuregulina i factor de cèl·lula mare [130][131][132][133][134][135]. No obstant, no es té coneixença de totes les funcions que els factors de creixement desenvolupen en la guia axonal. Els efectes en la guia que s'han descrit *in vivo* són d'atracció, però no de repulsió i la majoria s'han documentat en vertebrats.

Abans del descobriment de les molècules de guia axonal "canòniques" hi havia molt interès en la possibilitat de que les molècules d'adhesió cel·lular (CAMs) de les superfamílies d'Ig i Cadherina tenen funcions de guia axonal. De fet, el paper de l'adhesió hemofílica en la regulació de la fasciculació axonal es va descriure per Fasciclinall, molècula que pertany a la superfamília CAM d'Ig. No obstant, si parlem de guia i no de fasciculació d'axons, a mesura que han avançat els anys la idea de que aquestes molècules guien per mitjà de l'adhesió s'ha canviat per la possibilitat de que els membres d'aquestes famílies poden regular l'estimulació del creixement o l'atracció funcionant com a molècules de senyalització, sovint mitjançant combinacions heterofíliques i no homofíliques [51].

2.1.6 Noves molècules de guia axonal: FLRTs

Els FLRTs (Fibronectin Leucine-Rich Transmembrane proteins) són una família de proteïnes transmembrana composta per tres membres (FLRT1-FLRT3). Van ésser identificats en una cerca de proteïnes de la matriu extracel·lular expressades en múscul esquelètic humà. Es van identificar tres gens, FLRT1 localitzat en la regió cromosòmica 11q12-q13 té expressió en ronyó i cervell, FLRT2 localitzat en la regió cromosòmica 14q24- q32 té expressió en pàncrees, múscul esquelètic, cervell i cor, i FLRT3 localitzat en la regió cromosòmica 20p11 té expressió en ronyó, cervell, pàncrees, múscul esquelètic, pulmó, fetge, placenta i cor. Tots tres membres tenen en la part N-terminal un pèptid senyal seguit d'una regió rica en cisteïna, de deu

repeticions riques en leucina (LRR), d'una altra regió rica en cisteïna, d'un domini fibronectina de tipus tres (FNIII) i d'una regió juxtamembrana amb llocs de tall per metaloproteases. Tenen un domini transmembrana i una cua citoplasmàtica d'uns cent aminoàcids (**Figura 13**).

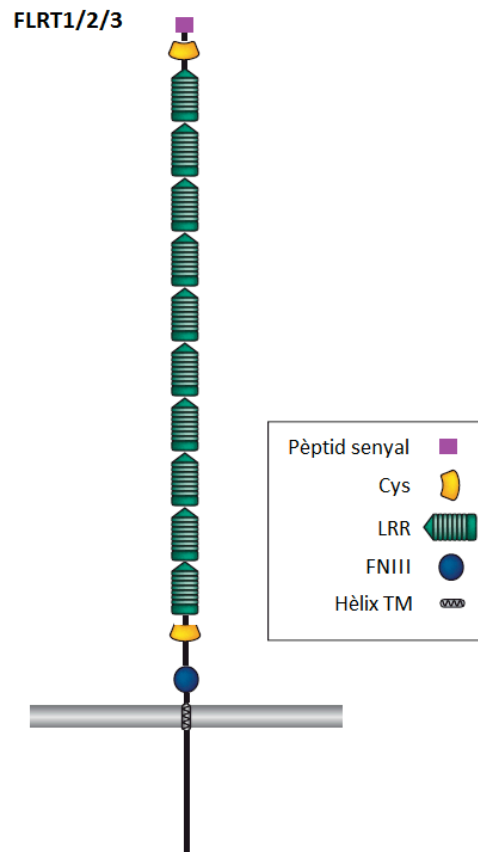


Figura 13 Estructura dels FLRTs. Els tres membres de família comparteixen els mateixos dominis. Estan implicats en mecanismes d'adhesió cel·lular, repulsió cel·lular, modulació senyalització FGF i desenvolupament de sinapsis. Són FLRT2 i FLRT3 els membres dels què es té més coneixement pel que fa a les seves funcions. Cys: regió rica en cisteïna, LRR: regió rica el leucina, FNIII: domini fibronectina de tipus tres i Hèlix TM: hèlix transmembrana.

A més a més en la part extracel·lular hi ha llocs de N-glicosilació: FLRT1 en 249N i 305N, FLRT2 en 203N, 299N, 390N, 433N i 521N, i FLRT3 en 226N, 282N, 296N i 508N. En termes d'homologia, FLRT1 i FLRT3 són un 55% idèntics, FLRT2 i FLRT3 són un 44% idèntics i FLRT1 i FLRT2 són un 41% idèntics [136]. Tots ells estan conservats al llarg de l'evolució de vertebrats.

Els FLRTs s'han classificat com molècules repulsives d'adhesió cel·lular (ReCAM) degut

a la seva funcionalitat dual, ja que se'ls han atribuït funcions d'adhesió cel·lular i també de repulsió en diferents contextos [137].

Fins l'actualitat diversos estudis han adreçat el paper dels FLRTs en l'adhesió cel·lular. S'ha descrit que tots els FLRTs poden interaccionar físicament entre ells i que cèl·lules que expressen FLRT es classifiquen de les que no els expressen de forma dependent de calci i independent de substrat fet que suggereix que les proteïnes FLRT proporcionen algun canvi en les propietats d'adhesió modulant així l'adhesió cel·lular homotípica. En aquest estudi també identifiquen que el domini que intervé en aquesta funció és el domini LRR [138]. Seguint amb aquestes interaccions homofíliques, recentment s'ha descrit en ratolí que els FLRTs regulen la petita dispersió tangencial que les neurones piramidals pateixen en l'escorça. Concretament és la interacció FLRT3-FLRT3, aquesta és de poca afinitat i també implica el domini LRR i permet una tracció cèl·lula-cèl·lula necessària per la migració i la dispersió tangencial d'aquestes neurones [139]. Altres exemples del paper dels FLRTs en adhesió és el que té lloc en l'endoderm visceral anterior (AVE) en ratolins. S'ha descrit que FLRT3 s'expressa en l'AVE durant la gastrulació. Aquesta regió de l'embrió és l'encarregada de secretar senyals activadores i inhibidores essencials per establir l'eix anterior-posterior (AP) de l'embrió i per restringir la formació del mesoderm a l'epiblast posterior en la línia primitiva (PS). El que s'ha vist en ratolins que no expressen FLRT3 és que hi ha una desorganització de la membrana basal (BM) en la regió AVE i que les cèl·lules de l'epiblast anterior adjacent presenten una transició epiteli-mesènquima (EMT) amb sobreexpressió de marcadors de mesoderm [140]. A més a més aquests ratolins també presenten defectes en la fusió/tancament de l'extrem cefàlic en el disc embrionari, en la migració de l'endoderm definitiu i en la fusió/tancament de la paret ventral, donant lloc al que s'anomena càrdia bífida [141]. Altres estudis realitzats en *Xenopus laevis* mostren com membres de la superfamília TGF β , Activina/Nodal, indueixen l'expressió de FLRT3 i de la RhoGTPasa Rnd1. A més a més descriuen la interacció física entre ambdós proteïnes i mostren com aquesta interacció s'encarrega de modular l'adhesió cel·lular durant el procés de gastrulació mitjançant el control dels nivells de Cadherina en la superfície cel·lular per la via endocítica dependent de dinamina. Aquesta interacció és important per permetre moviments cel·lulars dintre del teixit sense perdre la integritat d'aquest

durant l'embriogènesi [142]. Posteriorment es va afegir una nova molècula en aquesta funció, els receptors Unc5B. Es va descriure que FLRT3 i que Rnd1 interaccionen físicament i funcionalment amb Unc5B i que totes tres proteïnes modulen l'adhesió cel·lular durant el desenvolupament primerenc de *X. laevis*. Tant FLRT3 com Unc5B senyalitzen per mitjà de Rnd1 l'adhesió cel·lular [143]. En un altre estudi es va veure que la protocadherina paraxial (PAPC) quan s'expressa conjuntament amb FLRT3 limita l'activitat dissociativa d'aquest últim mitjançant la inhibició del reclutament de Rnd1 cap al domini citoplasmàtic de FLRT3 [144]. També s'han descrit per FLRT2 funcions relacionades amb l'adhesió. S'ha vist que FLRT2 s'expressa en nivells elevats en llocs on es produeix diferenciació condrogènica durant el desenvolupament craniofacial i que intervé promovent proliferació cel·lular i reduint l'adhesió intercel·lular durant etapes primerenques de la condrogènesi [145]. A més a més s'ha descrit el paper de FLRT2 en el manteniment de la integritat de les làmines epicardials, l'organització de la membrana basal i el gruix del miocardi ventricular durant la morfogènesi del cor. En aquest estudi veuen que els defectes en aquests processos produïts per la no expressió de FLRT2, poden ser revertits per l'expressió de FLRT3 [146].

El paper dels FLRTs en processos de repulsió s'ha descrit que és important per la regulació de la migració radial d'una subpoblació de neurones piramidals que es troben en la SVZ. Pel desenvolupament d'aquesta funció és essencial que es produeixin dues coses, en primer lloc el processament de FLRT2, que s'expressa en la CP, en la seva regió juxtamembrana i en segon lloc que aquesta subpoblació de neurones *Svet1* positives expressin el receptor Unc5D. El que es descriu en aquest treball és que el domini extracel·lular de FLRT2 (FLRT2-ECD) processat en la CP difon fins la SVZ on es troben aquestes neurones *Svet1* positives, un cop allí s'uneix als receptors Unc5D que també s'expressen i això evita la migració d'aquestes neurones. Un cop arribada l'hora de migrar a la CP, disminueix l'expressió del receptor Unc5D. En aquest estudi també descriuen que FLRT3 pot ésser processat per metaloproteases generant-se un FLRT3-ECD i que tant aquest com FLRT2-ECD són capaços d'actuar com a molècules de guia axonal repulsives per neurones que expressen els receptors Unc5. Ja que FLRT3 pot interaccionar amb un altre membre de la família de receptors, aquest és Unc5B [147]. Aquesta interacció entre FLRT3 i Unc5B s'ha vist que és important per la vascularització

de la retina. Els ratolins que no tenen expressió de FLRT3 o d'Unc5B mostren una retina més vascularitzada. És a dir, Unc5B regula negativament aquest procés i FLRT3 mitjançant la seva interacció amb Unc5B hi està implicat [139].

Els FLRTs a part d'intervenir en processos d'adhesió i de repulsió també s'ha descrit que està implicat en altres funcions. Una d'elles és la modulació de la senyalització FGF (factor de creixement de fibroblasts) mitjançant la interacció amb els receptors de FGF, FGFRs. En *X. laevis* FLRT3 es co-expressa amb FGF i la seva expressió està induïda després de l'activació i disminuïda després de la inhibició de la senyalització de FGF. En aquest mateix estudi també demostren que FLRT3 modula la senyalització de FGF per MAP quinasa. En un altre estudi es descriu com tots els FLRTs interaccionen amb FGFR1 independentment de lligand i poden ser induïts per l'activació de la senyalització FGF duta a terme per FGF2. Els FLRTs regulen la senyalització FGF sent induïts pel senyal i posteriorment interaccionant amb el receptor [148]. També s'han descrit els residus tirosina en el domini citoplasmàtic de FLRT1 que són fosforilats per mediació de FGFR1. Aquesta fosforilació implica l'activitat d'una quinasa de la família Src, SKF. L'expressió de FLRT1 resulta en un increment de l'activitat MAP quinasa de forma lligand dependent, però si FLRT1 no pot fosforilar-se hi ha una activació crònica de la senyalització de FGFR per MAP quinasa independent de lligand. L'activitat FLRT1-FGFR1 induïx el creixement neurític via activació MAPK. La fosforilació de FLRT1 per SKF modula la seva habilitat d'activar la via MAPK dependent de FGFR1 i independent de lligand i induir creixement neurític [149]. També s'ha descrit la interacció entre FLRT2 i FGFR2 en teixit craniofacial tant per la part extracel·lular com per la part intracel·lular. Aquesta interacció podria representar un mecanisme per regular la senyalització FGF via FLRT2 durant el desenvolupament craniofacial [150]. Una altra funció diferent a l'adhesió i repulsió és la sobreexpressió de FLRT3 en axons axotomitzats i la seva capacitat de promoure creixement neurític [151] i [152] a part de la seva funció en l'establiment de sinapsis [153]. En aquesta última s'ha descrit que FLRT2 i FLRT3 interaccionen amb Latrofilina3 (LPHN3) un receptor que pertany a una petita família de receptors acoblats a proteïna G que estan implicats en produir una excitosi sinàptica massiva causada pel verí de l'aranya viuda negra, α -latrotoxina. FLRT3 és el lligand post-sinàptic de LPHN3, és a dir, interaccionen en *trans* amb els

dominis extracel·lulars i aquesta interacció és important pel desenvolupament de les sinapsis glutamatèrgiques i en regula el nombre [153]. Seguint amb aquesta interacció, recentment s'ha publicat l'estructura d'alguns dominis de LPHN3, Lec i Olf, i els dominis de FLRT importants en la interacció. S'ha vist que ambdós proteïnes interaccionen pel domini de FLRT que està implicat en la interacció amb altres FLRTs i no pel domini que interacciona amb Unc5 i pel domini Olf de LPHN3. A més a més, i mitjançant assajos "stripe" s'ha vist que aquesta interacció controla adhesió cel·lular i repulsió [137].

2.2 Senyalització en el con de creixement

La clau perquè una molècula de guia desencadeni una funció en les cèl·lules recau en la seva habilitat per transmetre senyals extracel·lulars en canvis en la morfologia cel·lular. En les neurones que s'estan desenvolupant això resulta en una extensió dirigida del con de creixement, en un canvi en la direcció de creixement o en una retracció [36][58][35][154]. Canvis en el citoesquelet del con de creixement permeten que el con desencadeni totes aquestes respostes. Les molècules de guia poden influenciar en la trajectòria del con de creixement perquè alteren el muntatge, el desmuntatge i la dinàmica dels components del citoesquelet. I també poden influenciar l'adhesió o la deadhesió al substrat sobre el què es troben. En el con de creixement hi ha filaments d'actina (F-actina) i microtúbuls; es produeix polimerització d'actina en l'extrem del con de creixement que avança i hi ha despolimerització d'aquesta simultàniament en la part interior del con. La modulació d'aquest procés de polimerització-despolimerització dels F-actina és el que fa que el con de creixement pugui créixer. Els microtúbuls es troben en feixos en la part central del con de creixement, però també hi ha polímers individuals de microtúbuls en les regions perifèriques que s'estenen i es retrauen per sobre dels F-actina. En la regió en què aquests polímers individuals s'estabilitzin sobre la F-actina determina la direcció de creixement del con. Les molècules de guia poden influenciar aquest dinamisme del citoesquelet per mitjà dels seus receptors específics [51].

2.2.1 Segons missatgers

El calci (Ca^{2+}) i els nucleòtids cíclics (AMPC i GMPc) intervenen en la senyalització dels receptors i poden modular la força de les seves respostes. Aquests dos sistemes estan relacionats en la regulació de la guia del con de creixement ja que la senyalització de calci pot promoure la producció de nucleòtids cíclics mitjançant l'activació de l'enzim adenilat ciclase i de la sintasa d'òxid nítric (NOS), al seu torn els nucleòtids cíclics poden regular la concentració cel·lular de calci controlant l'activitat dels canals de calci de la membrana i alliberant calci de l'emmagatzematge intern [155][156].

L'exposició dels cons de creixement a gradients de molècules de guia pot induir un increment de calci en la regió propera al gradient [156][157]. Aquest canvi asimètric en les concentracions de calci són senyals instructives per dirigir un gir en el con de creixement, ja que l'increment focal de calci és suficient per induir respostes de canvi de direcció de creixement. L'increment en l'entrada de calci i l'alliberament de l'emmagatzematge pot ser induït per molècules de guia i el resultat en el comportament del con de creixement (atracció o repulsió) pot ser influenciat per la magnitud de l'increment de calci i la font d'on prové el calci [156][155]. En general, increments moderats de calci donen lloc a atracció, mentre que increments alts o baixos donen lloc a repulsió [154].

Mesures electrofisiològiques dels cons de creixement indiquen que les molècules de guia atractives i repulsives poden induir canvis ràpids en el potencial de membrana. Les molècules atractives generen despolarització i les repulsives hiperpolarització [158][154]. Per exemple, Netrin quan s'uneix a DCC promou l'alliberament de calci del seu emmagatzematge intracel·lular i l'activació dels canals de calci, llavors es produeix una despolarització de la membrana depenent d'aquests canals de calci que és suficient per activar canals de calci dependents de voltatge i el resultant influx de calci és essencial per produir l'atracció [159].

Els nivells de nucleòtids cíclics (AMPC o GMPc), específicament el ràtio AMPC/GMPc, pot determinar si la resposta a una molècula de guia serà atractiva o repulsiva. Si el ràtio AMPC/GMPc és elevat s'afavoreix atracció i si el ràtio és baix s'afavoreix repulsió

[160]. A més a més, els nucleòtids cíclics també poden modular la força de les respostes que originen els receptors. Per exemple, en *D. melanogaster* l'AMPC per via de PKA (Proteïna Quinasa A) pot modular la repulsió. Concretament, s'ha vist que la proteïna Nervy uneix el receptor PlexinaA amb PKA per inhibir la repulsió de Sema [161]. No obstant, també hi ha exemples on l'AMPC o el GMPc tenen funcions com a efectors en la senyalització induïda pels receptors. Per exemple, la senyalització Sema-Plexina induïx la producció de GMPc i aquest promou repulsió regulant la hiperpolarització de la membrana i el influx de calci [162]. L'atracció induïda per Netrin a través de DCC requereix un increment dels nivells d'AMPC i l'activació de PKA de forma dependent de DCC [154]. Tot i que hi ha altres estudis que mostren que no és així, i que PKA és necessària per regular la resposta a Netrin promovent un increment en els nivells de DCC en la membrana [163][164][165].

Les dianes efectores en la senyalització per calci i nucleòtids cíclics inclouen quinases com PKA, PKC, Src i CamKinasall; calcineurina i fosfatasa PP1; calpaina; i la família RhoGTPases [154].

2.2.2 Traducció local

Les diferents molècules de guia axonal poden induir la traducció de diferents mRNAs i la traducció local proveeix un control espaciotemporal sobre el proteoma del con de creixement en resposta a l'activació localitzada de receptors. La traducció local controla decisions de la guia axonal [166].

Normalment els cons de creixement es troben lluny del cos neuronal, però tot i la distància continuen mostrant respostes a les diferents senyals; fet que indica que el con de creixement actua com una regió semi-autònoma que conté tota la maquinària necessària per detectar i respondre als estímuls del medi extracel·lular [167][168][169].

S'ha trobat que les respostes d'alguns axons a alguns estímuls es veuen inhibides per inhibidors de la síntesi de proteïnes com la ciclohexamida, fet que demostra que la natura autònoma dels cons de creixement implica traducció local de mRNA [168][169]. La restricció espaciotemporal de l'expressió dels receptors de les molècules guia és

essencial per canviar la sensibilitat del con de creixement a les molècules que es troben en les dianes intermèdies [79][170].

El transport de proteïnes, incloent endocitosi i exocitosi, la degradació de proteïnes i la síntesi local de proteïnes són tres mecanismes que permeten regular la localització de les proteïnes en els diferents compartiments cel·lulars [168][171][172]. La traducció local proporciona un ràpid proveïment d'una proteïna que pot marcar la diferència en la resposta del con de creixement al medi que l'envolta [173].

La primera evidència de síntesi de proteïnes en els axons va aparèixer fa més de quaranta anys utilitzant tècniques de marcatge metabòlic. Es va veure que hi havia ribosomes en els axons juntament amb altres components de la maquinària de traducció [174][175][176][177][178]. Adreçar la funcionalitat de la traducció local de mRNA en l'axó no ha estat fàcil per la dificultat tècnica d'inhibir la síntesi únicament en el compartiment axonal. Tot i així, s'ha pogut anar avançant en el camp i s'ha vist que la dependència de les respostes del con de creixement a la traducció local varia depenent de la concentració de la molècula guia [179][180]. Aquest mecanisme possiblement permet que els cons de creixement extreguin més informació del limitat grup de molècules guia. Però, quins són els mRNAs que pateixen traducció local i que són crítics per la guia axonal? Doncs s'ha trobat el mRNA de la β -actina, de RhoA, de cofilina i de molècules d'adhesió en el con de creixement. S'ha vist que Netrin indueix la traducció local de la β -actina en la regió propera a la font de Netrin i també s'ha vist que Slit o Sema3A indueixen la traducció local dels mRNAs de RhoA i de cofilina, molècules que controlen la polimerització d'actina [169][181][182][183]. Aquesta traducció local induïda per les molècules de guia modula les vies que són importants per la guia mitjançant la sobreexpressió espaciotemporal dels seus components. Aquest procés és ràpid, de l'ordre de minuts i té lloc abans de que es produeixi la resposta del con de creixement [166].

Per regular la síntesi de proteïnes amb precisió espacial i temporal, el con de creixement necessita mecanismes per evitar la traducció del mRNA que no es desitja. La majoria de proteïnes d'unió a RNA que estan implicades en el seu transport reprimeixen la traducció, fet important per evitar la traducció abans de que el mRNA

arribi a la seva destinació. Estudis on es bloqueja l'activitat d'aquestes proteïnes d'unió a RNA mostren com apareixen defectes en guia axonal [182][184][185][186]. Per activar la traducció també hi ha diversos mecanismes, alguns funcionen trencant els complexos entre les proteïnes d'unió a RNA i el mRNA [187].

2.2.3 *RhoGTPases*

La regulació de la polimerització d'actina en l'extrem del fil·lopodi, la despolimerització d'actina en les regions proximals del con de creixement i la taxa de flux retrògrad de F-actina en el fil·lopodi controlen el creixement i la retracció del con de creixement. Per tant, les molècules atractives poden promoure polimerització d'actina i prevenir el flux retrògrad, mentre que les molècules repulsives tenen papers oposats en aquests processos [188].

Les RhoGTPases formen una subfamília de la superfamília Ras de petites GTPases. Són considerades molècules capaces de transduir senyals d'estímuls extracel·lulars al citoesquelet d'actina i al nucli. Les RhoGTPases ciclen entre un estat actiu i un inactiu mitjançant la unió a nucleòtids guanina. En el seu estat unides a GTP, interaccionen amb proteïnes efectores i es consideren actives, mentre que quan es produeix la hidròlisi del GTP a GDP per la seva activitat GTPasa intrínseca es trenquen aquestes interaccions amb les proteïnes efectores i es consideren inactives. Dos tipus de proteïnes faciliten l'alternança entre aquests dos estats: les GEFs (factors d'intercanvi de nucleòtids guanina) que estimulen l'intercanvi de GDP a GTP i per tant, les activen; i les GAPs (proteïna activadora de GTPases) que contribueixen a la seva inactivació incrementant l'activitat GTPasa endògena [189][190][80].

La interacció entre les molècules de guia i els seus receptors activa determinats membres d'aquesta família RhoGTPasa a través de la interacció directa o indirecta amb GAPs i GEFs. Els membres més estudiats són Cdc42, Rac1 i RhoA. En neurones, el model actual proposa que l'activació de Cdc42 i Rac1 estimula creixement axonal, mentre que l'activació de RhoA inhibeix el creixement o indueix col·lapse del con de creixement. L'activació de Cdc42 i Rac1 per una senyal atractiva es transduïda per diferents efectors com PAK1 o N-WASP. Cdc42 i Rac1 activats produeix una disminució

en el flux retrògrad i en la taxa de despolimerització de l'actina, induint així la generació de nous filaments i consegüentment, induint el creixement axonal. Contràriament, les molècules repulsives generalment inhibeixen Rac1 i Cdc42 i activen RhoA, l'efector del qual és ROCK, generant respostes de repulsió (Figura 14) [191][192]. Les RhoGTPases també tenen un paper en la regulació de microtúbuls [193]. Rac1 i Cdc42 estableixen microtúbuls per mitjà de PAK1 [194].

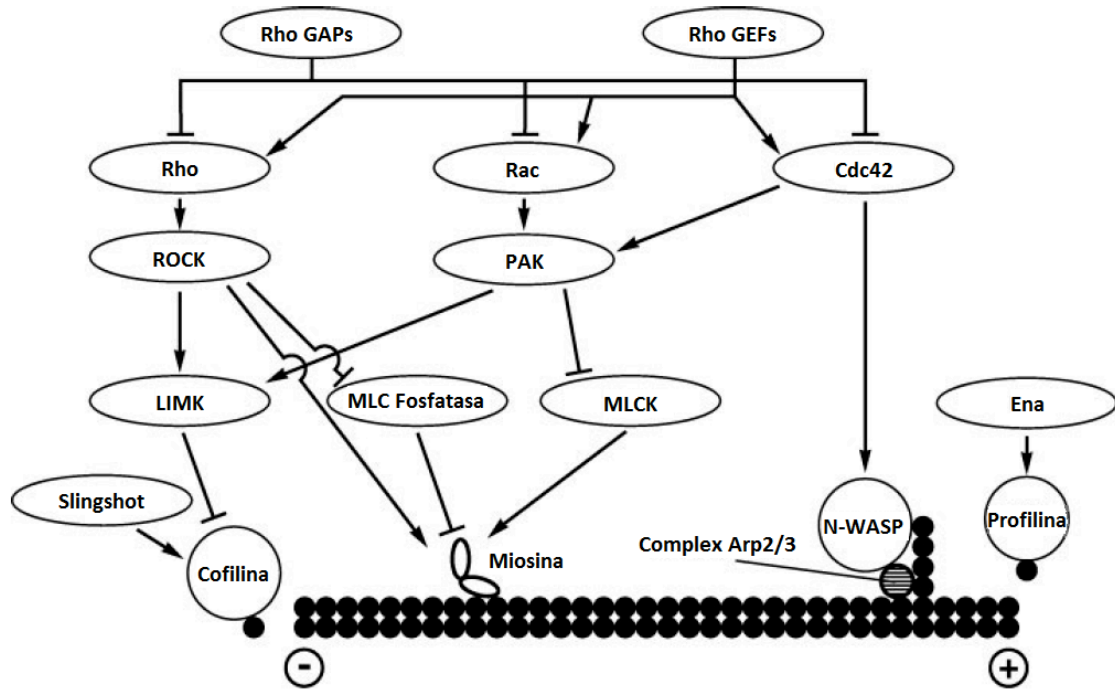


Figura 14 Regulació de la dinàmica de l'actina per les RhoGTPases. Els efectors de les RhoGTPases en la polimerització d'actina en els extrems + són N-WASP i VASP/Ena. N-WASP és un regulador del complex Arp2/3, qui controla la ramificació i nucleació de l'actina. Concretament, quan Cdc42 està actiu s'uneix a N-WASP i aquest s'uneix i activa al complex Arp2/3 qui promou la nucleació de l'actina. La polimerització de l'actina està regulada per la proteïna de unió a monòmers d'actina, profilina, qui dirigeix l'addició d'actina en l'extrem +. Les proteïnes de unió a profilina de la família VASP/Ena són moduladores d'aquest procés. L'efector de les RhoGTPases en la despolimerització d'actina en els extrems - és cofilina. El reclutament i activació de PAK per Rac o Cdc42 actius i de ROCK per RhoA actiu resulta en la fosforilació de LIMK i l'activació de la seva activitat quinasa. LIMK activat fosforila i inactiva a la cofilina, atenuant així la despolimerització d'actina. La cofilina també està regulada per la serina-treonina fosfatasa Slingshot qui desfosforila i activa la cofilina promovent la despolimerització d'actina. L'efector de les RhoGTPases en el control del flux retrògrad de F-actina es la miosina. ROCK i MLCK acaben fosforilant a la F-actina. ROCK evita de desfosforilació i inactivació de la miosina mitjançant la fosforilació i la inhibició de MLC Fosfatasa. L'activació de Rac o Cdc42 resulta en la desfosforilació de la

miosina, fan l'efecte per mitjà de PAK que fosforila i inactiva MLCK. Adaptat de [188].

La resposta del con de creixement a una molècula de guia pot estar determinada més pel balanç de les RhoGTPases actives que per l'activació d'un membre de la família en particular. Per tant, la interacció entre les molècules de guia i els seus receptors en la superfície del con de creixement produeix diferències espaials en l'activació dels membres de la família RhoGTPasa. Això estimula una activació asimètrica de molècules efectores que dona lloc a una organització asimètrica del citoesquelet, determinant així la direcció del creixement del con [80].

Cada receptor de guia axonal s'ha descrit que regula l'activitat de diverses RhoGTPases després d'unir-se al seu lligand específic (**Figura 15, 16 i 17**).

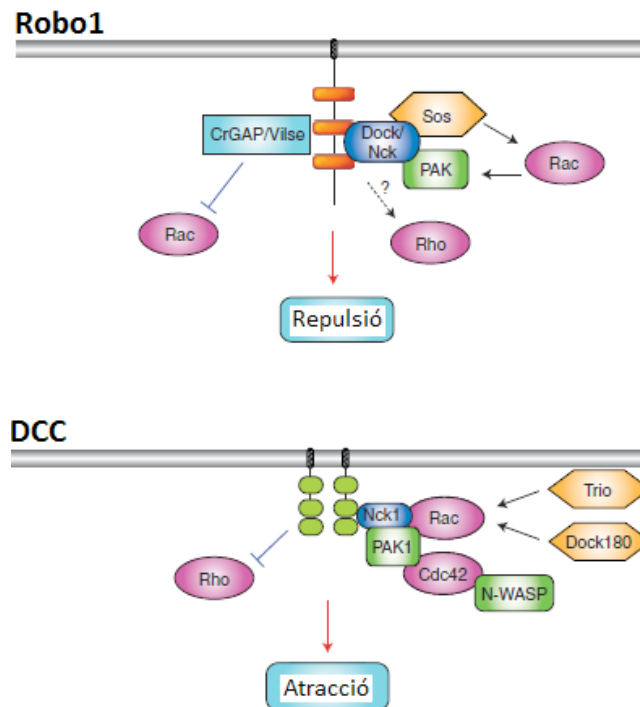


Figura 15 Relació entre Robo1 / DCC i les RhoGTPases. L'activitat de Rac està regulada per la interacció Robo1-Slit per mitjà de la GEF Sos i de la GAP CrGAP/Vilse. La presència de Slit recluta la proteïna adaptadora Dreadlocks (Dock en *D. melanogaster* / Nck en vertebrats) i PAK en els dominis citoplasmàtics conservats (CC) de Robo1. El complex Robo1/Dock interacciona amb Sos i activa a Rac. El paper de les RhoGTPases en la senyalització Slit/Robo no està clar i depèn del context neuronal. Els homodímers DCC promouen atracció del con de creixement per mitjà de l'activació de Rac, Cdc42 i PAK. Quan Netrin s'uneix a DCC, la proteïna adaptadora Nck (qui interacciona constitutivament amb DCC), Rac activa, Cdc42, Pak1 i N-WASP són reclutades formant un complex amb la regió intracel·lular de DCC fet que promou la reorganització del citoesquelet d'actina del con de creixement. Les GEFs DOCK180 i

Trio estan implicades en l'activació de Rac depenent de Netrin. DCC possiblement bloqueja l'activitat de Rho i ROCK, no obstant, els mecanismes de senyalització que porten a la modulació de l'activitat Rho no estan molt clars i probablement tenen relació amb altres GTPases. Només es mostren els dominis intracel·lulars de Robo1 (tampoc el domini CC0) i de DCC. Adaptat de [195].

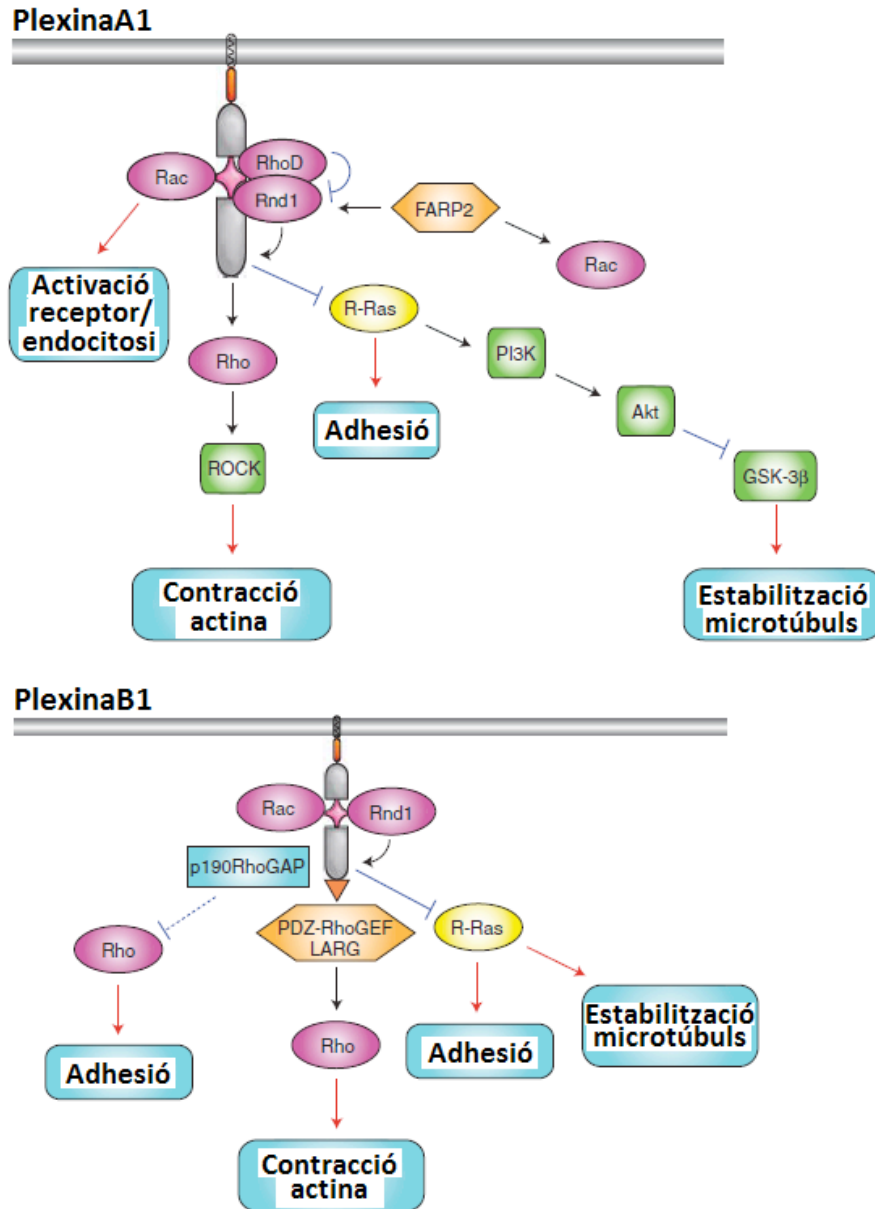


Figura 16 Relació entre PlexinaA1 / PlexinaB1 i les RhoGTPases. La senyalització dels receptors PlexinaA1 implica un increment en l'activitat de Rho, fet que genera un increment de la contractilitat d'actina degut a l'activitat de ROCK. La interacció directa de RacGTP a la regió d'unió a GTPases que té Plexina pot induir un canvi conformacional en el domini citoplasmàtic de Plexina i promoure l'endocitosis del receptor. Sema3A indueix la dissociació de la GEF FARP2 del complex PlexinaA1/neuropilina i promou el reclutament de Rnd1 cap a PlexinaA1. La interacció PlexinaA1-Rnd1 obre els dos dominis GAP R-Ras (gris) i provoca la inactivació de R-Ras. Aquest fet promou el col·lapse del con de creixement

mitjançant la inhibició de l'adhesió per integrines i promovent la desestabilització de microtúbuls (mitjançant una disminució de l'activitat PI3K/Akt i un increment de l'activitat GSK3). L'activitat Rho per sota de PlexinaB1 es veu inhibida per p190RhoGAP, possiblement per inhibir la funció de les integrines. Quan el receptor uneix a Sema, el domini d'unió a PDZ que tenen exclusivament la família dels receptors PlexinaB (taronja) interacciona amb les GEFs PDZ-RhoGEF i LARG i això activa a Rho i genera col·lapse del con de creixement. L'associació amb Rnd1 és necessària per permetre l'activitat de la GAP R-Ras. Només es mostra el domini intracel·lular de PlexinaA i B. Adaptat de [195].

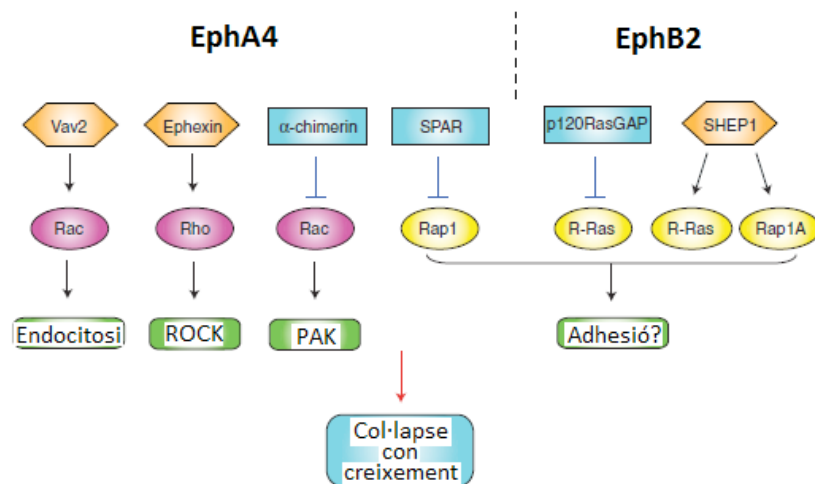


Figura 17 Relació entre EphA4 / EphB2 i les RhoGTPases. La inhibició de la via Rac/PAK, per la GAP α -chimerin, podria funcionar conjuntament amb l'activació de Rho, per ephexin, per controlar la reorganització del citoesquelet que porta al col·lapse del con de creixement. No obstant, l'activació de Rac, per Vav2, també pot contribuir a aquest col·lapse estimulant l'endocitosi del complex Efrina/Eph. La regulació de R-Ras i Rap1 a través de GAPs, SPAR i p120RasGAP, i de GEFs, SHEP1, és necessària en la senyalització de Eph. Adaptat de [195].

2.2.4 Endocitosi i exocitosi de receptors

Regular els nivells dels receptors de guia proveeix un potent mecanisme per regular les respostes. Per exemple, en la línia mitja de *D. melanogaster* Comm controla el creuament de la línia mitja regulant negativament Robo i prevenint que les neurones comissurals responguin prematurament a Slit que s'expressa en la línia mitja. El mRNA de Comm està detectat en una petita finestra de temps en les neurones comissurals mentre que arriben a la línia mitja. Diverses evidències indiquen que Comm pot recluir Robo directament als endosomes per degradar-lo abans de que arribi a la superfície cel·lular i això és important per regular la repulsió de la línia mitja [196]. En un altre exemple, els nivells en la superfície cel·lular dels membres de la família DCC, que tenen

un paper fonamental en promoure el creuament de la línia mitja pels axons comissurals, també estan regulats. DCC es troba en dos llocs, en la membrana i en vesícules intracel·lulars. L'estimulació amb Netrin dóna lloc a un increment en els nivells de DCC en la membrana i aquest efecte es veu incrementat per l'activació de PKA. Concretament, PKA mobilitza el DCC intracel·lular donant lloc a l'increment d'aquest en la membrana i al creixement axonal [163]. El bloqueig de l'adenilat ciclase, de l'activitat de PKA o de l'exocitosi prevé l'increment dels nivells de DCC en la membrana i el creixement axonal induït per Netrin. Altres estudis han vist que inhibint l'activitat Rho també es contribueix a la mobilització de DCC [197].

En diversos casos, l'endocitosi de receptors sembla ser un pas obligatori en la seva activació induïda per la unió al lligand. Per exemple, la GEF Vav2 regula l'endocitosi de receptors Eph. Efrines i Ephs contribueixen a la guia dels axons de les cèl·lules ganglionars de la retina (RGC) cap al sistema visual. Els cons de creixement que no tenen Vav no col·lapsen en resposta a Efrines, al contrari els cons que sí que expressen Vav. A més a més, marcant els receptors Eph de la superfície cel·lular en aquests cons de creixement que no tenen Vav es veu com hi ha un dèficit en l'endocitosi dels receptors en resposta a Efrines. Fet que suggereix que ha d'haver-hi una endocitosi dels receptors Eph activats perquè es desencadeni la senyalització que porta al col·lapse i a la retracció del con de creixement [198].

A part de contribuir a la senyalització dels receptors, l'endocitosi pot modular les respostes mitjançant la regulació de quins receptors estan expressats en la superfície del con de creixement. Un exemple és l'endocitosi d'Unc5 en neurones de vertebrats. L'activació de PKC (Proteïna Quinasa C) promou la formació d'un complex proteic que inclou el domini citoplasmàtic d'Unc5, Pick1 i PKC que dóna lloc a l'eliminació d'Unc5 de la superfície del con de creixement, però no de DCC. La reducció dels nivells d'Unc5 de la superfície cel·lular correlaciona amb la inhibició del col·lapse del con de creixement dependent de Netrin en cultiu primaris de neurones hipocampals [199]. A més a més, l'activació de PKC fa que Unc5 co-localitzi amb marcadors endosomals, donant suport a la idea que la inhibició del col·lapse del con de creixement és deguda a l'endocitosi d'Unc5. Per tant, l'eliminació d'Unc5 de la superfície per PKC proveeix un

mecanisme canviar la resposta de Netrin de repulsió induïda per Unc5 o Unc5-DCC a atracció induïda per DCC [200]. També s'ha vist que el receptor de Netrin A2b intervé en l'activació de PKC, ja que l'activació d'A2b dóna lloc a l'endocitosi d'Unc5 dependent de Netrin [201].

2.2.5 Processament de receptors

Igual que l'endocitosi, el processament proteolític contribueix a l'activació dels receptors i modula les seves respostes. Primer es va veure que els cons de creixement secretaven proteases i es va proposar que era per tallar components de la matriu extracel·lular per tal de poder avançar a través del medi extracel·lular [202]. Diversos estudis han implicat a metaloproteases ADAM i a metaloproteases de la matriu en la guia axonal del sistema nerviós de vertebrats i invertebrats [203][204]. Per exemple, bloquejant l'efecte de metaloproteases sobre DCC i evitant que s'alliberi el seu ectodomini resulta en una expressió de DCC en la membrana més elevada que potencia el creixement axonal induït per Netrin [205].

Diversos estudis han implicat a la metaloproteasa Kuzbanian (Kuz)/ADAM10 en la senyalització d'alguns receptors. Per exemple, Kuz/ADAM10 regula el tall dels receptors Eph i dels lligands Efrina. ADAM10 forma un complex estable amb EfrinaA2 i quan aquesta interacciona amb el receptor Eph, el complex resultant lligand-receptor és tallat per ADAM10 [206][207]. La família de metaloproteases de la matriu està implicada en el processament de EphB2, fet que canvia l'adhesió produïda per la interacció EfrinaB-EphB2 a retracció axonal quan es talla el receptor [208]. Kuzbanian també s'ha implicat en la repulsió induïda per Slit a través de Robo en *D. melanogaster*. Concretament, en els mutants de Kuz les interneurons ipsilaterals creuen la línia mitja, és a dir, han perdut la susceptibilitat de ser repel·lides pel Slit de la línia mitja. Es creu que Kuz és un regulador positiu de la senyalització Slit-Robo [209]. Posteriorment, en *D. melanogaster* també, es va confirmar aquesta hipòtesi. Es va veure que Kuz era important pel processament de Robo i que si Robo no es processa no té l'activitat repulsiva normal. A més a més, es va veure que l'activitat de Kuz és necessària perquè Robo recluti al seu efector de senyalització Son of sevenless (Sos). Per tant, el processament de Robo per Kuz és important per l'activació del

receptor. El procés és el següent: en primer lloc Slit s'uneix a Robo i llavors Kuz talla a Robo. L'alliberació de l'ectodomini de Robo causa un canvi en la conformació de la part intracel·lular que continua ancorada a la membrana i permet la interacció d'aquesta amb Dock. Sos és reclutat per Dock, i activa a Rac qui acaba promovent la repulsió [210].

Kuzbanian va ser identificada en *D. melanogaster* pel seu paper en la regulació de la senyalització Notch durant la neurogènesi [211]. Kuz talla a Notch, s'allibera el domini extracel·lular de Notch i s'indueix el tall de la part intracel·lular, mitjançant γ -secretasa, alliberant al domini intracel·lular (ICD) que es transloca al nucli on actua com a factor de transcripció [212]. Diversos estudis han mostrat com receptors de guia axonal com DCC o Eph i també Efrines pateixen aquest tipus de processament seqüencial, primer es produeix el tall en la part extracel·lular per metaloproteases i després el tall en la part intracel·lular per γ -secretases [213].

2.3 Integració de les molècules de guia axonal

Un sistema nerviós funcional es construeix durant el desenvolupament per diferents poblacions neuronals que es connecten entre si de forma molt específica. Un patró estereotipat de connexions s'estableix en primer lloc d'acord amb un programa genètic que especifica el conjunt de receptors de guia que són expressats per cada població neuronal. Aquest patró estereotipat és subseqüentment redefinit per l'activitat neuronal. Durant l'inici, en la fase de guia independent d'activitat, els axons són guiats cap a la diana sinàptica correcta per mitjà de molècules de guia atractives i repulsives que es troben al llarg del camí que recorren [214].

Molts estudis han adreçat les funcions d'una determinada molècula guia present de forma independent, tot i que quan els axons estan viatjant en cada lloc on han d'escollir el camí a seguir estan confrontats a diverses senyals al mateix temps. Però com s'integren aquestes senyals múltiples en el con de creixement perquè aquest esculli el camí correcte cap a la seva cèl·lula diana? Diversos estudis suggereixen que hi ha dos tipus d'escenaris principals: que els efectes de les molècules siguin additius o que siguin no additius.

En el primer cas, les diferents molècules guia exerceixen les seves accions de forma independent (o en paral·lel). Actuen de forma cooperadora o oposada dependent de la natura bioquímica de cadascuna d'elles i de la seva distribució espacial, però el resultat net és la suma dels efectes de cada molècula per separat. Diversos exemples de cooperació entre els sistemes de guia axonal s'han descobert gràcies a estudis en els axons comissurals de la medul·la espinal (**Figura 18**).

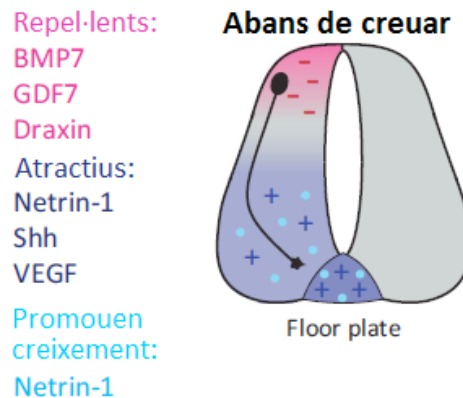


Figura 18 Efecte additiu de molècules de guia axonal en la medul·la espinal. Axons comissurals creuant la línia mitja en una medul·la espinal de vertebrats. En primer lloc, els axons comissurals són guiats cap al “floor plate” pels repel·lents que s’expressen dorsalment (gradient rosa), per les molècules atractives que s’expressen en la part ventral (gradient blau) i per factors que promouen creixement (punts blau clar). Adaptat de [214].

Els cossos de les neurones comissurals estan situats en la part dorsal de la medul·la espinal i els seus axons, en primer lloc, viatgen ventralment cap al “floor plate” guiats per repel·lents dorsals i molècules atractives de la línia mitja ventral [215][216]. Tres proteïnes secretades pel “floor plate” ventral de la medul·la espinal, Netrin1, Shh i VEGF, actuen com a quimioattractives i canvien la direcció de creixement del axons comissurals que encara no han creuat la línia mitja, *in vitro*. Els seus respectius receptors, DCC, Boc i Flk1, es troben en els axons comissurals [217][90][85]. Els ratolins knock-out per alguna d’aquestes molècules mostra errors en la via que segueixen els axons comissurals per creua la línia mitja de la medul·la espinal [123][217][218]. Mentre que totes elles són molècules quimioattractives, Netrin1, a més a més, té propietats que promouen el creixement i que permeten que els axons envaeixin la medul·la espinal ventral [123][218]. Tot i que els estudis genètics suggereixen que les

tres molècules actuen de forma additiva, aquest fet encara no s'ha confirmat en experiments quantitius *in vitro* després de la presentació simultània dels lligands. Experiments futurs podran revelar possibles interaccions, ara desconegudes, entre aquestes molècules; en les vies de senyalització o en l'expressió, transport, activació o processament dels receptors d'aquestes molècules.

En el segon cas, els sistemes de guia interaccionen amb un resultat net diferent al de la suma dels efectes de cada molècula de forma individual. La interacció entre les vies de senyalització pot tenir lloc a nivell dels lligands, dels seus receptors de membrana o dels seus efectors intracel·lulars. Hi ha tres possibilitats: que hi hagi una interacció jeràrquica, una interacció sinèrgica o una interacció permissiva. En el cas de la interacció jeràrquica, hi ha una molècula que és la dominant i suprimeix l'activitat de l'altra. Un exemple molt estudiat és la regulació negativa que Slit/Robo fa sobre Netrin/DCC. En els primers experiments en què es van cultivar neurones espinals de *X. laevis* es va veure que l'atracció cap a Netrin1 es veia bloquejada en presència de Slit [219]. El silenciament d'aquesta atracció generada per Netrin1 és degut a la interacció directa entre els dominis intracel·lulars de Robo1 i DCC que es veu estimulada quan Slit s'uneix a Robo1 (**Figura 19**). Aquesta interacció és important *in vivo* per la guia dels axons comissurals que han creuat la línia mitja, els quals adquireixen la capacitat de respondre a Slit quan travessen el "floor plate". A més a més, Slit a part de repel·lir apaga la senyalització d'atracció cap a Netrin1, que s'expressa en el "floor plate", facilitant la sortida dels axons comissurals de la línia mitja.

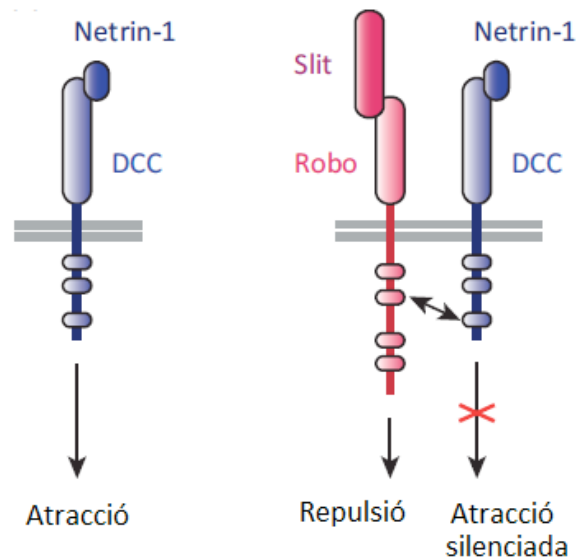


Figura 19 Interacció jeràrquica entre molècules de guia axonal. L'atracció induïda per Netrin1 per mitjà de DCC es veu inhibida per Slit/Robo1. Concretament, degut a la interacció directa entre els dominis intracel·lulars de Robo1 i DCC. Aquest mecanisme s'ha descrit en *X. laevis* i és important perquè els axons comissurals no re-creuin la línia mitja de la medul·la espinal. Adaptat de [214].

En el cas de la interacció sinèrgica, les molècules poden interaccionar promovent el mateix comportament del con de creixement. La població d'axons motors de LMC_L (columna lateral motora) que innerven les extremitats són atrets cap al mesènquima dorsal de les extremitats per GDNF i EphAs [132][220][221][222]. De fet, GDNF i EphAs actuen sinèrgicament a través d'un receptor en comú, el receptor de GDNF anomenat Ret. EfrinaAs, que en aquest cas funcionen com a receptors de EphAs, no tenen domini intracel·lular i necessiten un co-receptor de membrana per transmetre senyals cap a l'interior de la cèl·lula. Es va veure que les EfrinaAs co-localitzen i interaccionen directament amb Ret. Els efectes d'estimulació de creixement de EphA en els axons motors són incrementats amb l'addició de GDNF i es bloquegen en explants d'embrions Ret^{-/-}. A més a més, quan s'afegeixen els dos lligands promouen una gran resposta d'atracció en els axons LMC. S'ha proposat que Ret actua integrant les dues senyals d'atracció per assegurar una resposta més forta dels axons quan s'exposen a EphAs i GDNF [221] (**Figura 20**).

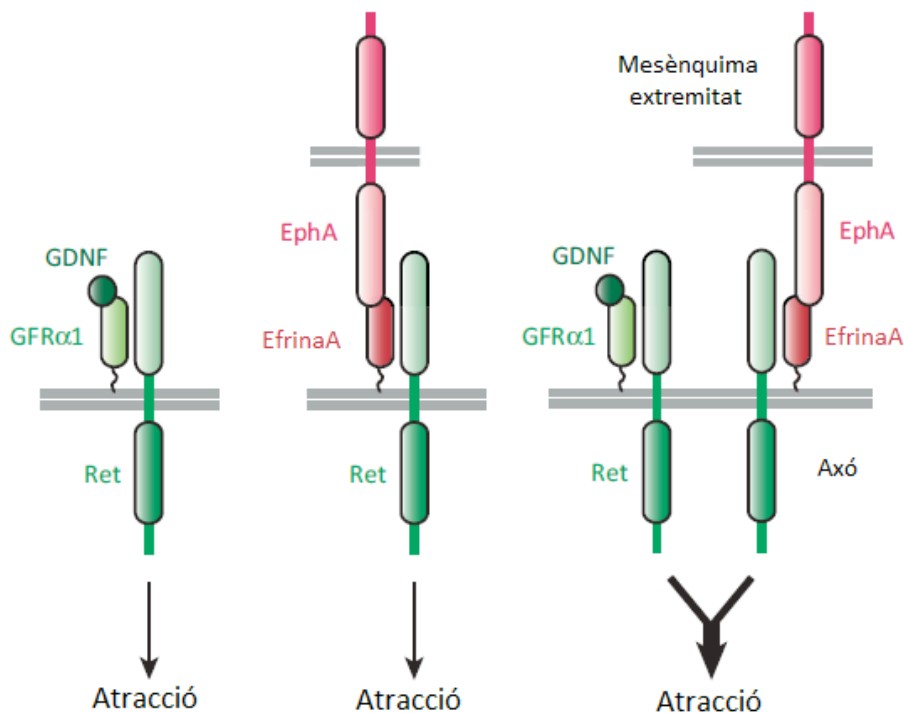


Figura 20 Interacció sinèrgica entre molècules de guia axonal. Sinèrgia entre GDNF i EphAs en la guia dels axons motors. GDNF (esquerra) i EphAs (centre) indueixen una resposta quimioattractiva per les neurones motores LMC_L a través de la unió amb els seus respectius receptors que estan ancorats a la membrana per GPI, GFRα1 i EfrinaA. Aquests receptors senyalitzen a través del co-receptor transmembrana Ret. L'estimulació simultània (dreta) amb els lligands GDNF i EphAs promou una resposta d'atracció més potent. Adaptat de [214].

I en el cas de la interacció permissiva, hi ha exposició a una molècula (permissiva) que permet als axons esdevenir sensibles a una altra (instructiva) que els proveeix la informació direccional. Un exemple interessant d'aquesta darrera possibilitat és el té lloc en els axons talamocorticals on els efectes de la combinació de Slit i Netrin s'ha vist que juga un paper molt important en la seva topografia. Concretament, Slit juga un paper permissiu, mentre que Netrin és la molècula instructiva per un grup d'aquests axons talamocorticals. Ambdós, Slit i Netrin, es detecten en forma de gradient rostral alt i caudal baix en el "corridor", lloc on es produeix la classificació inicial de les fibres talamocorticals (**Figura 21**). En cultius d'explants talàmics Slit repel·leix als axons talamocorticals rostrals quan s'aplica de forma independent, mentre que Netrin de forma independent no té cap efecte sobre ells. Sorprenentment, la combinació d'ambdues molècules desencadena una resposta d'atracció. En altres experiments, s'ha vist que en aquesta situació Slit no proveeix informació direccional als axons, però

que permet la seva atracció cap a Netrin [223].

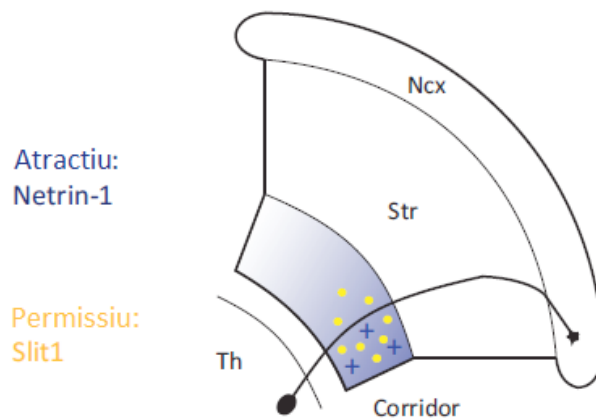


Figura 21 Interacció permissiva entre molècules de guia axonal. Netrin1 i Slit1 s'expressen en la regió anomenada "corridor", on es produeix una separació topogràfica inicial. La presència de Slit1 permet que els axons talàmics rostrals siguin atrets cap a la font de Netrin1, qui per sí mateixa no és capaç de desencadenar cap resposta. Th: tàlem, Ncx: escorça en desenvolupament i Str: estriat. Adaptat de [214].

En cultius d'explants talàmics Slit repel·leix als axons talamocorticals rostrals quan s'aplica de forma independent, mentre que Netrin de forma independent no té cap efecte sobre ells. Sorprenentment, la combinació d'ambdues molècules desencadena una resposta d'atracció. En altres experiments, s'ha vist que en aquesta situació Slit no proveeix informació direccional als axons, però que permet la seva atracció cap a Netrin [223].

3. Guia axonal en els principals tractes axonals del prosencèfal

En l'escorça cerebral existeixen diversos tipus de neurones de projecció que envien axons a diferents regions del sistema nerviós. Aquest procés és fonamental per la correcta funcionalitat de l'escorça cerebral. Existeixen neurones de projecció associativa que estenen els seus axons dintre d'un mateix hemisferi cortical, neurones de projecció comissural que estenen els seus axons creuant la línia mitja cap a l'hemisferi contralateral i projeccions corticofugals que estenen els seus axons lluny de l'escorça [2].

Les neurones de projecció associativa es troben en totes les capes corticals i inclouen neurones de projecció intrahemisfèrica de curta distància i de llarga distància. Les

primeres estenen axons dintre d'una columna cortical o a les columnes corticals del voltant com per exemple les neurones granulars (GN). Les segones estenen axons cap a les àrees corticals adjacents o distals com per exemple les neurones que projecten rostral i caudalment [2].

Les neurones de projecció comissural es localitzen en les capes II/III, V i VI de l'escorça i estenen els seus axons a través del cos callós cap a la mateixa àrea funcional de l'hemisferi contralateral com per exemple les neurones de projecció callosa (CPN) (**Figura 22**). Aquest tracte permet la integració bilateral de la informació [2].

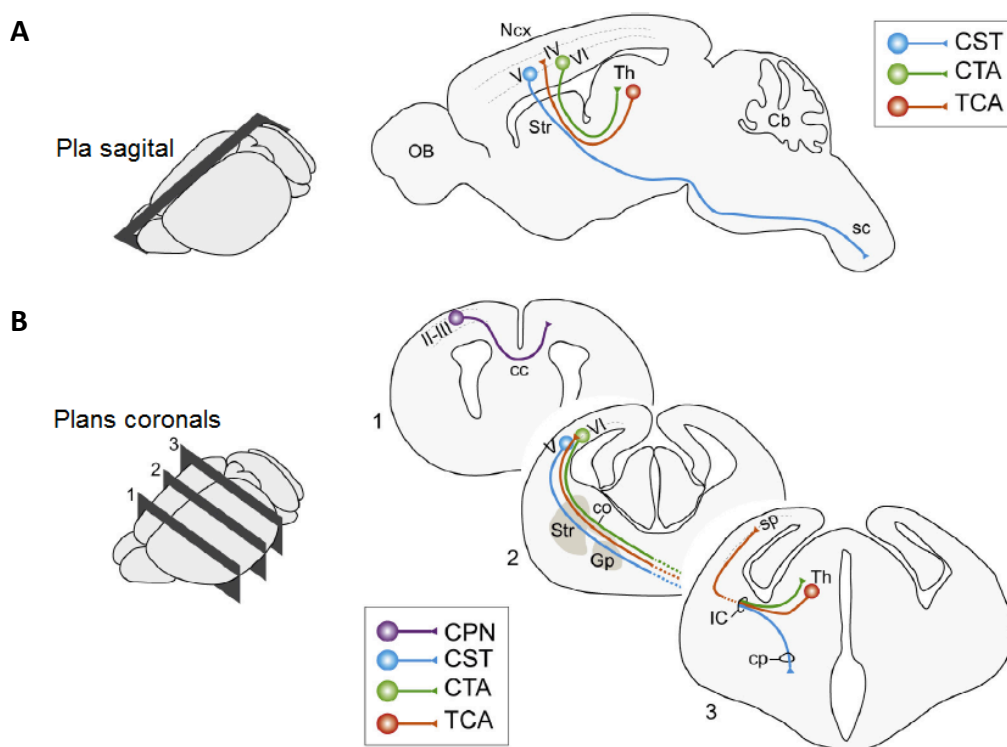


Figura 22 Principals tractes axonals del cervell de ratolí. Representació de les neurones de projecció callosa (CPN) en violeta, del tracte corticoespinal (CST) en blau, de les projeccions corticotàlmiques (CTA) en verd i de les projeccions talamocorticals (TCA) en vermell en una secció sagital de cervell de ratolí (A) i en una sèrie de seccions coronals (B). OB: bulb olfactiu, Str: estriat, co: "corridor", Gp: globus pàl·lid, Th: tàlem, Cb: cerebel, Ncx: escorça, sp: subplaca, cc: cos callós, IC: càpsula interna, cp: peduncle cerebral i sc: medulla espinal. Adaptat de [224].

Les neurones de projecció corticofugal inclouen les neurones de projecció corticotàlmica (CThPN) i les neurones de projecció subcerebral (SCPN) (**Figura 22**). Les primeres es troben principalment en la capa VI de l'escorça i estenen els seus axons

cap a diferents nuclis talàmics. Les segones es troben en la capa V de l'escorça i estenen els seus axons cap a diferents dianes del tronc cerebral i de la medulla espinal, entre elles es troben les motoneurons corticoespinals (CSMN) [2].

L'escorça cerebral, però, apart d'enviar axons cap a diferents àrees del sistema nerviós també en rep, com és el cas de les projeccions talamocorticals en què els diferents nuclis talàmics estenen els seus axons cap a diferents àrees corticals (**Figura 22**).

Els principals tractes axonals del cervell que s'utilitzen en l'estudi dels mecanismes moleculars dels processos de guia axonal són les projeccions calloses, les projeccions corticoespinals, les projeccions corticotalàmiques i les projeccions talamocorticals.

3.1 Projeccions calloses

La majoria d'informació que arriba a les neurones corticals prové d'altres neurones corticals, si aquestes es troben en el mateix hemisferi s'anomenen connexions corticocorticals ipsilaterals i si es troben en hemisferis oposats s'anomenen connexions calloses que tenen un paper fonamental en la connectivitat associativa de gran nivell. Defectes en la seva formació són els causants de síndromes cognitius com l'autisme [224].

Els dos hemisferis cerebrals es comuniquen per mitjà del major tracte axonal que existeix en el cervell mamífer, el cos callós. Tot i que no és l'únic que els comunica. El cos callós està format per axons d'una diversa població de neurones piramidals corticals anomenades CPN que principalment (aproximadament el 80%) resideixen en les capes II/III de l'escorça cerebral, un 20% es troben en la capa V i un percentatge molt petit en la capa VI [225][226][227][228][229][230][231][232]. Aquestes neurones comencen a enviar els seus axons quan encara estan migrant cap a la placa cortical, procés regulat en part per molècules com Sema3A qui s'expressa en forma de gradient, alt lateral i baix medial, en l'escorça i repel·leix els axons fora de la zona marginal. Concretament, aquestes molècules fan que els axons callosos girin cap a la línia mitja quan es troben en la zona intermèdia de l'escorça (**Figura 23**) [233][234].

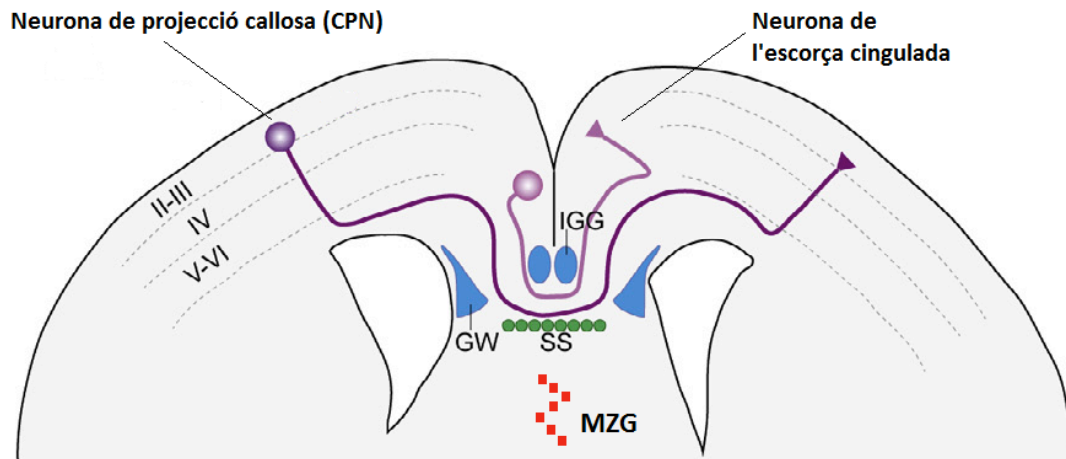


Figura 23 Formació del tracte axonal callós. En lila obscur està representada una neurona de projecció callosa de la capa II/III. En lila clar està representada una neurona de l'escorça cingulada que actua com a substrat pels axons de les CPN per creuar la línia mitja. En blau, verd i vermell diverses estructures glials que alliberen molècules de guia axonal per guiar els axons callosos a creuar la línia mitja. IGG: indusium griseum glia, GW: glial wedge, SS: subcallosal sling (neurones circumvolució subcallosa) i MZG: midline zipper glia. Adaptat de [224].

Els axons callosos són projectats cap a la línia mitja seguint una trajectòria ventral i travessant l'escorça cingulada, posteriorment giren abruptament per creuar la línia mitja en el límit cortico-septal. Quan els axons arriben a la línia mitja són guiats per estructures glials allí presents (glial wedge, GW, i indusium griseum, IGG), per neurones de la circumvolució subcallosa i per molècules de guia axonal de rang-curt de la família Eph/Efrina (**Figura 23**) [235][236].

La GW és una estructura glial bilateral simètrica que allibera diverses molècules repulsives com Slit2, Draxin i Wnt5a per evitar el creixement ventral dels axons CPN dintre del sèptum [237][238][68][239][240][241][242]. La IGG és una àrea de neurones i glia posicionades dorsalment al cos callós que expressen Slit2 i actuen com a barrera dorsal repulsiva pels axons CPN [239]. Algunes de les funcions de guia de la circumvolució subcallosa són generades per Sema3C a través del receptor Neuropilina1 expressat en els axons CPN [235][243][244]. Neuropilina1 s'expressa en els axons pioners de l'escorça cingulada i s'ha vist que està implicat en la formació del cos callós (**Figura 24**) [245][246][244].

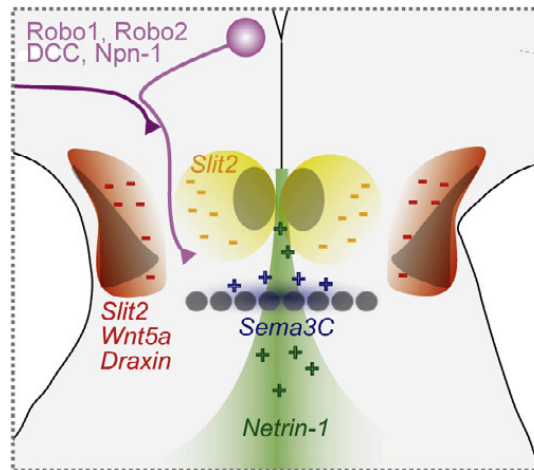


Figura 24 Mecanismes moleculars de guia axonal de les neurones CPN. Esquema que mostra els gradients de les diferents molècules de guia axonal presents en la línia mitja del prosencèfal i els receptors expressats en els axons callosos. Els axons pioners (lila clar) provenen de l'escorça cingulada i els axons callosos (lila fosc) els fan servir de substrat per poder avançar i creuar la línia mitja. En la GW (taronja) hi ha expressió de Slit2, Wnt5a i Draxin. En l'IGG (groc) hi ha expressió de Slit2. En la circumvolució subcallosa hi ha expressió de Sema3C i de Netrin-1. Totes aquestes molècules de guia axonal guien als axons callosos perquè travessin la línia mitja del prosencèfal i es formi finalment el cos callós. Adaptat de [224].

No obstant, els primers axons en creuar la línia mitja del cos callós (a E14-E15) són els de l'escorça cingulada que actuen com a xarxa estructural per guiar els axons callosos que la creuen posteriorment (a E17) [229][247][225][243]. És a dir, els axons callosos segueixen per mitjà d'un contacte axó-axó als cingulats, procés on intervé Neuropilina1 [248][246]. En els axons callosos s'ha descrit l'existència d'un mecanisme d'integració de molècules de guia axonal. Concretament, Netrin1 inicialment atreu els axons callosos pioners que deriven de l'escorça cingulada, però no els axons callosos que deriven de l'escorça. De fet, Netrin1 atenua la senyalització repulsiva Slit/Robo en aquests axons provinents de l'escorça que encara no han creuat la línia mitja per permetre'ls creuar-la (**Figura 24**) [244]. Un cop l'han creuat arriben a les seves dianes en l'hemisferi contralateral i les innerven de forma homotòpica, és a dir, la localització de cos de les CPN en l'escorça determina la diana dels seus axons (**Figura 23**). No obstant, els mecanismes que regulen la diana específica dels axons CPN en la part contralateral encara no són coneguts, tot i que s'ha proposat que podrien seguir la trajectòria de la glia radial de l'hemisferi contralateral [248].

3.2 Projeccions corticoespinals

El tracte corticoespinal constitueix unes de les projeccions longitudinals més llargues en el sistema nerviós de vertebrats i la major sortida d'informació de l'escorça motora (M1), que connecta l'escorça cerebral amb la medul·la espinal.

Aquests axons corticoespinals surten de neurones piramidals de la capa V de l'àrea sensoriomotora de l'escorça i es coneixen com CSMN [249].

Les CSMN envien axons a diversos llocs a part de a la medul·la espinal, com és a l'estriat, al nucli vermell, a la part caudal de la protuberància i al bulb raquidi. Aquestes neurones estenen els seus axons a través d'una regió anomenada càpsula interna (IC) que es troba en el telencèfal ventral, continuen ipsilateralment respecte la línia mitja i descendeixen cap a la zona ventral del peduncle cerebral a través del mesencèfal i romboencèfal fins que arriben a la part més caudal d'aquest últim on la majoria creuen dorsalment la línia mitja cap al costat contralateral formant la decussació piramidal. Després projecten caudalment dintre de la MZ de la medul·la espinal, el funicle dorsal, i innerven neurones localitzades en la substància gris espinal. Els que no creuen la línia mitja continuen descendint pel funicle ventral, a prop de la línia mitja, i llavors decussen i innerven la substància gris de la medul·la espinal (**Figura 25**) [250][251].

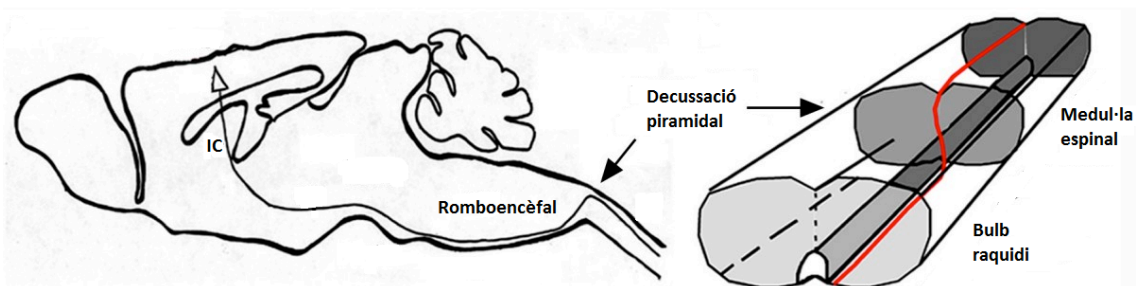


Figura 25 Tracte corticoespinal. Les CSMN envien els seus axons travessant la IC fins la part més caudal del romboencèfal, el bulb raquidi, on es produeix la decussació piramidal en què la majoria d'axons creuen la línia mitja i continuen avançant contralateralment fins arriba a les seves dianes de la medul·la espinal. Adaptat de [252].

Igual que en les projeccions calloses, el front del tracte corticoespinal està compost per un petit nombre d'axons pioners mentre que la resta els segueixen en feixos molt fasciculats. El tracte es manté fasciculat fins que arriba a la medul·la espinal on es

defascicula i els axons s'escampen, en el nivell precís, per connectar amb la diana específica de la substància gris de la medul·la espinal. Aquesta diana pot ser una altra motoneurona que al seu torn innerva una fibra de múscul esquelètic o una interneurona que innerva a una motoneurona que al seu torn innerva una fibra de múscul esquelètic [224].

Quan el tracte corticoespinal està completament desenvolupat permet l'execució de moviments precisos per diferents músculs, és a dir, les CSMN formen la base dels moviments voluntaris.

Molecularment, la trajectòria dels axons corticoespinals és el resultat de la combinació de diverses molècules de guia axonal que actuen en diferents punts d'elecció al llarg del seu viatge. Les molècules de guia de les etapes primerenques, mentre arriben a la IC, són probablement les mateixes per tots els axons corticofugals. L'expressió coordinada de la molècula atractiva Sema3C i de la repulsiva Sema3A, mitjançant la interacció amb els receptors Neuropilina dels axons, es creu que contribueix al creixement ventral inicial dels axons des de la placa cortical fins la zona intermèdia (IZ) a E12.5 [253]. A més a més, s'ha vist que la senyalització Sema3A implica a la molècula d'adhesió cel·lular L1 com a part del complex de receptors amb Neuropilina1 durant el creixement primerenc en l'escorça [119].

Netrin1, provinent de les eminències ganglionars, proporciona un gradient quimioatractiu per les projeccions subcorticals que es troben en la IZ [254][255], aquestes giren en direcció contrària a la línia mitja i viatgen per la IZ fins a arribar al límit pal·lial subpal·lial (PSPB). Un cop dintre de la IC, els axons corticoespinals es separen dels corticotalàmics i entren en el peduncle cerebral. Slit1 i Slit2 estan implicats en mantenir un posicionament dorsoventral dels axons corticofugals dintre de la IC i en evitar el creixement axonal cap a i a través de la línia mitja [238]. Tant Robo1 com Robo2 s'expressen en els axons corticals en desenvolupament [241].

Posteriorment, els axons creuen el mesencèfal i es dirigeixen cap a la part ventral de la protuberància amb una fasciculació més laxa. Durant el naixement, arriben a la part caudal del bulb raquidi on la majoria d'axons (80-85%) decussen en la unió amb la

medul·la espinal [256]. Diverses molècules s'han implicat en la decisió de creuar la línia mitja. La senyalització de Netrin1 a través de DCC i Unc5 en combinació amb la molècula d'adhesió L1 i la molècula d'adhesió neuronal NCAM és essencial per la guia correcta dels axons corticoespinals en el bulb raquidi i en la línia mitja [257][258][259]. A més a més, els resultats dels mutants per aquestes molècules suggereixen que Netrin1 actua dirigint el creixement dels axons corticoespinals principalment a nivell dels axons pioners, mentre que NCAM i L1 actuen sobre els axons que els segueixen per regular les interaccions entre ambdós tipus d'axons [260]. Més recentment, alguns estudis suggereixen que Sema6A-PlexinaA3/A4 intervien en la repulsió que dirigeix als axons de les CSMN cap a la línia mitja on es produeix la decussació [261][252].

Després de creuar la línia mitja en la part caudal del rombencèfal, els axons d'aquestes neurones projecten caudalment en fonicle dorsal de la medul·la espinal. La presència del factor de creixement insulina-like 1 (IGF1) i el gradient decreixent de Wnt1 i Wnt5a en la matèria gris neonatal envoltant el fonicle dorsal ajuda a dirigir als axons corticoespinals, que expressen el receptor IGF1 i el receptor Ryk, cap als nivells lumbar de la medul·la espinal [224]. Cada axó dels que segueix als axons pioners ha de sortir del fonicle dorsal en una posició determinada al llarg de la medul·la espinal per generar les connexions topogràficament específiques amb la seva neurona diana del corn dorsal. Els nivells decreixents d'EphA4 dintre del fonicle dorsal que envolten els axons descendents permet la sortida dels axons de les extremitats anteriors que no expressen EfrinaA5 cap a l'ampliació cervical i evita que els axons de les extremitats posteriors que expressen EfrinaA5 surtin fins que no arribin a l'ampliació lumbar diversos dies després. Després de la ramificació en el fonicle dorsal, els axons colaterals del tracte corticoespinal entren a la matèria gris de la medul·la espinal. Els estadis primerencs d'innervació i restricció cap a regions medials de la medul·la són parcialment controlats per EphA4, i aquesta molècula també intervé en la guia final dels axons corticoespinals cap a la seva diana en el corn dorsal [262][263]. Finalment, les interaccions repulsives entre el receptor EphA4 expressat en els axons corticoespinals i els lligands EfrinaB3 expressats en la part ventral de la línia mitja evita que els axons decussats la recreuin cap al costat ipsilateral [262][264][265][266].

3.3 Projeccions corticotalàmiques i talamocorticals

3.3.1 *Desenvolupament de les projeccions corticotalàmiques*

El tàlem i l'escorça cerebral representen una unitat de processament altament integrada que regula la transmissió talàmica d'informació sensorial (excepte olfacte) pel seu processament cortical. Totes les àrees corticals reben informació del tàlem al mateix temps que hi envien projeccions [224]. Aquesta reciprocitat permet d'una banda modular l'activitat talàmica i d'altra distribuir la informació a les àrees corticals disperses, és a dir, integra totes les àrees corticals en una única xarxa que permet la sincronització de les poblacions talàmiques i corticals [267].

Els axons corticotalàmics (CTA) surten de neurones corticofugals localitzades majoritàriament en la capa VI de l'escorça i una petita població es troba en la capa V [268][269][270]. El circuit engloba tres poblacions corticals i dos nuclis talàmics. El component cortical consisteix en neurones de projecció glutamatèrgiques que es troben en la capa IV, V i VI de l'escorça. El nucli talàmic anomenat nucli talàmic de primer ordre inclou el nucli dorsal lateral (dLGN), el nucli ventrobasal (VB), el nucli geniculat medial (MGN), el nucli ventrolateral (VL) i el grup talàmic anterior. Aquest nucli conté cèl·lules que processen i reenvien la informació sensorial que arriba de la perifèria cap a l'escorça. L'altre nucli talàmic s'anomena nucli talàmic d'ordre superior i inclou el grup pulvinar, el grup talàmic mediodorsal i el nucli posterior lateral. Aquest nucli conté cèl·lules de la matriu talàmica que estableixen una connexió entre capes superiors i inferiors de l'escorça fet que integra totes les regions corticals entre sí **(Figura 26)** [271][272].

Els nervis perifèrics recullen la informació sensorial i l'envien al nucli talàmic de primer ordre, aquest estableix connexions amb les capes corticals IV i VI, les neurones colaterals d'aquestes capes estableixen connexió amb les neurones GABAèrgiques del nucli talàmic reticular (RTN) qui al seu temps connecta amb el tàlem. Es forma un circuit inhibitori que està implicat en modular l'activitat del tàlem que és reenviar informació a l'escorça **(Figura 26)** [271][273][274].

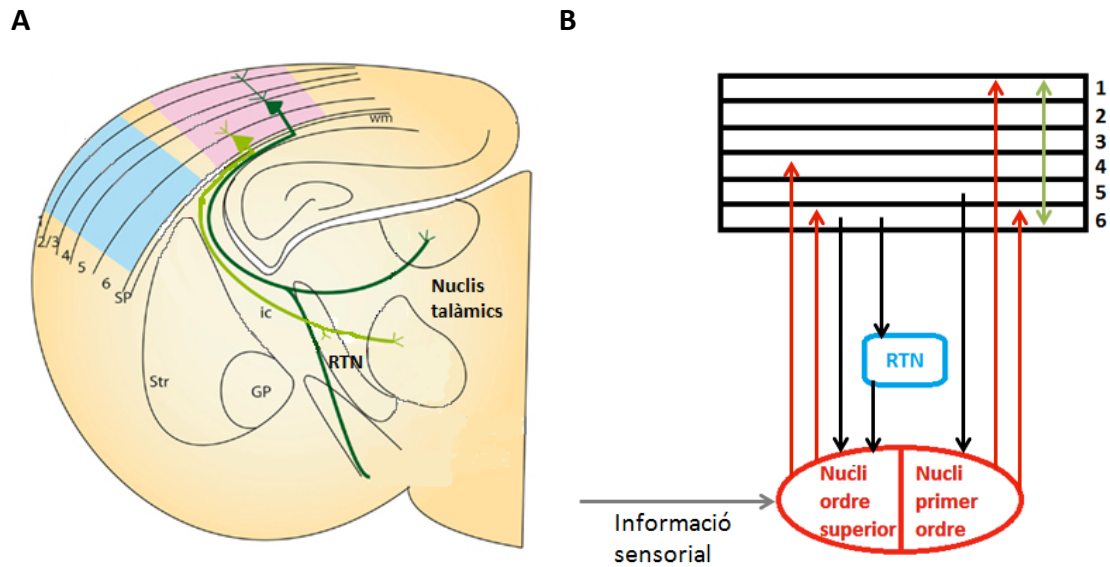


Figura 26 Projeccions corticotalàmiques. A) Secció coronal de cervell de ratolí on estan representades les projeccions corticotalàmiques. En verd clar les que provenen de neurones de la capa 6 i innerven el nucli talàmic de primer ordre. En verd fosc les que provenen de neurones de la capa 5 i innerven el nucli talàmic d'ordre superior. Adaptat de [274]. B) Esquema representatiu de la xarxa establerta entre tàlem i escorça.

La innervació cortical dels nuclis talàmics depèn de la identitat laminar de les neurones corticals. Les neurones de la capa VI de l'escorça fan sinapsis glutamatèrgiques en les dendrites distals de les neurones del nucli talàmic de primer ordre. Per exemple les neurones de l'escorça visual primària (V1) innerven el nucli geniculat dorsal lateral (dLGN), les neurones de l'escorça somatosensorial primària (S1) innerven el nucli ventrobasal (VB) i les neurones de l'escorça auditiva (A1) innerven el nucli geniculat medial (MGN) [274]. Les neurones de la capa V fan sinapsi en els terminals glutamatèrgics de les cèl·lules de la matriu del nucli talàmic d'ordre superior (**Figura 26**) [272][267].

Les neurones piramidals de projecció comencen a estendre neurites quan encara estan migrant cap a la placa cortical [5][275]. Com passa en els axons corticoespinals, els CTA són repel·lits de la placa cortical per Sema3A i atrets cap a la zona intermèdia (IZ) per Sema3C [253][276][277]. L'expressió de Sema3A i de Sema5B en la zona ventricular (VZ) evita que els axons corticals penetrin en la zona germinal [253][278]. El gradient, alt lateral i baix medial, de Sema3C en la IZ atreu als axons corticotalàmics cap a

l'escorça lateral [253][279]. Les projeccions s'estenen per la IZ de l'escorça, posteriorment creuen el límit pal·lial-subpal·lial (PSPB) i avancen fins arribar a la càpsula interna (IC) lateral, a E13-E15.5 [268][280], on els axons laterals que són els que arriben primer fan una pausa breu fins que arriben els axons caudals, ja que aquests han de recórrer una major distància [281][282]. El PSPB és un punt important de decisió on les projeccions corticofugals giren abruptament de la seva trajectòria ventrolateral cap a una trajectòria medial per entrar en el subpal·li [282][283]. Netrin1, expressada en la IC i en el telencèfal ventral atreu als CTA que expressen DCC [284]. Aquesta atracció sembla ser la responsable de la reorientació d'aquests axons cap al telencèfal ventral [254][255]. Alternativament, la repulsió induïda per Sema5B també estaria implicada en aquest gir degut a la seva expressió en l'escorça lateral que flanqueja la trajectòria d'aquests axons que creuen el PSPB [277][278]. A més a més, l'expressió de Sema5B en les zones germinals de les eminències ganglionars i en el globus pà·llid assegura que els axons corticotalàmics es quedin en la IC [277][278]. La família Slit/Robo també assegura en manteniment d'aquests axons en la IC, i quan arriben al límit diencèfal-telencèfal (DTB) els dirigeixen dorsalment cap al tàlem [238][241][285]. Slit1 i Slit2 s'expressen conjuntament en les eminències ganglionars, el pre-tàlem, l'hipotàlem i la zona germinal del tàlem [238]; mentre que Robo1 i Robo2 s'expressen de forma complementària en la placa cortical, la zona intermèdia i el tàlem [241]. En mutants de Slit2, en dobles mutants de Slit1 i Slit2 i en dobles mutants de Robo1 i Robo2 les projeccions corticotalàmiques presenten defectes severos [238][241]. Un cop en el DTB, els axons corticotalàmics entren en el pre-tàlem i es troben amb les cè·l·lules del nucli talàmic perireticular (PRN) i del RTN, a E16. En aquest punt es dona una segona pausa fins a E17.5 [280][282], després d'aquest període d'espera en el RTN envaeixen el tàlem en un procés que dura diversos dies i on la majoria d'innervacions dels nuclis talàmics té lloc postnatalment (en rates, ratolins i hámsters) [268][286][282][280]. Aquest segon període d'espera encara no es sap perquè es dona, ja que el control molecular d'aquest dinamisme és difícil d'esbrinar (**Figura 27**) [274]. Les molècules implicades en aquest últim pas comencen a ser descobertes. Ephs i Efrines, Semaforines, Slits i Netrins s'expressen de forma diferencial en els nuclis LGN i MGN i per tant aquestes diferències són les que probablement contribueixen

l'especificitat de les connexions amb els nuclis talàmics [287].

Mentre que el control espacial de la guia axonal i de la formació de les xarxes de connexions està ben descrit, no es coneix gaire de la regulació temporal. El control molecular de la dinàmica temporal com els períodes d'espera és difícil d'esbrinar. Tot i que comencen a haver-hi nous descobriments que suggereixen algun mecanisme: Robo1 s'expressa en els axons corticotalàmics i sembla actuar de fre pel creixement axonal ja que els axons corticotalàmics mutants per Robo1 arriben a les seves dianes un dia abans de l'habitual [288][289]. A més a més, el segon període d'espera és necessari perquè es trobin amb els axons talamocorticals i és regulat per modificacions temporals en les propietats de les neurones corticals [290]. Un estudi indica que la regulació temporal de la senyalització Sema3E/PlexinaD1 controla i participa en la guia de les projeccions recíproques entre tàlem i escorça [290].

3.3.2 Desenvolupament de les projeccions talamocorticals

El tàlem és una regió central del cervell que es desenvolupa en la part diencefàlica del prosencèfal i la major estació de reenviament d'informació del sistema nerviós, rebent la majoria d'informació sensorial (tots els sentits menys l'olfacte) i connectant recíprocament amb l'escorça. En mamífers està format per desenes de nuclis morfològicament i funcionalment diferents [224].

Les projeccions talàmiques dels diferents nuclis van dirigides cap a les zones corticals d'on reben els axons corticotalàmics (CTA). La majoria dels axons talàmics fan sinapsi en neurones de la capa IV de l'escorça, però també n'hi ha que innerven la capa I, II/III i VI. Com ja s'ha explicat en el punt 3.3.1 les neurones d'aquestes capes envien axons cap al nucli talàmic reticular (RTN) el qual projecta cap al tàlem, formant-se així una xarxa que regula l'activitat de les neurones talàmiques [271][273][224]. Les connexions recíproques entre tàlem i escorça tenen àrea i làmina específica, són similars en totes les àrees i molt conservades entre espècies. A més a més, donades diverses evidències s'ha postulat la hipòtesi "hand shake" que afirma que els axons corticotalàmics i els talamocorticals s'ajuden entre sí per guiar-se durant les seves trajectòries [224].

Les projeccions talamocorticals constitueixen una de les connexions de processament

d'informació d'alt nivell del cervell de mamífer. Aquestes projeccions envien informació sensorial i motora cap a l'escorça cerebral, on la integració d'aquesta informació dona lloc a la percepció i a l'organització de les respostes apropiades a estímuls interns i externs [291].

La innervació de l'escorça cerebral pels axons talamocorticals (TCA) és un fet que es produeix tardanament en el desenvolupament, tot i que el creixement d'aquests axons cap a les dianes corticals comença aviat en l'embriogènesi, fins i tot abans de l'establiment de les connexions dels aferents corticals al tàlem [291].

La complexitat funcional de les projeccions talamocorticals és la conseqüència d'un procés extremadament elaborat de guia axonal que uneix els diversos nuclis talàmics amb regions corticals específiques [291].

Entre E13-E18 l'escorça i el tàlem comencen a unir-se per mitjà de connexions recíproques i específiques. Tant els CTA com els TCA han de creuar diverses regions que tenen propietats moleculars diferents per arribar a les seves cèl·lules diana. Els TCA segueixen una via estereotipada des de l'origen en el tàlem fins la seva diana en l'escorça [292][293]. En el tàlem viatgen rostralment cap al telencèfal i fan un gir dorsal en el límit diencèfal-telencèfal (DTB) per entrar a la regió del mantell de l'eminència ganglionar medial (MGE) on entren a la càpsula interna (IC), a E13. Llavors, avancen a través de l'estriat i finalment arriben a l'escorça (**Figura 27**) [292].

En mamífers els axons arriben a l'escorça abans de que les seves cèl·lules diana hagin nascut, fet que fa que s'hagin d'esperar en la SP durant dos o tres dies, a E16-E19, fins que poden tornar a créixer i innervar les neurones en la placa cortical apropiada, procés que es produeix després del naixement [224][294].

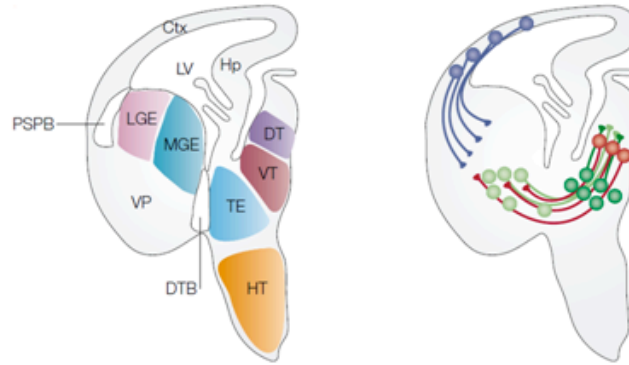
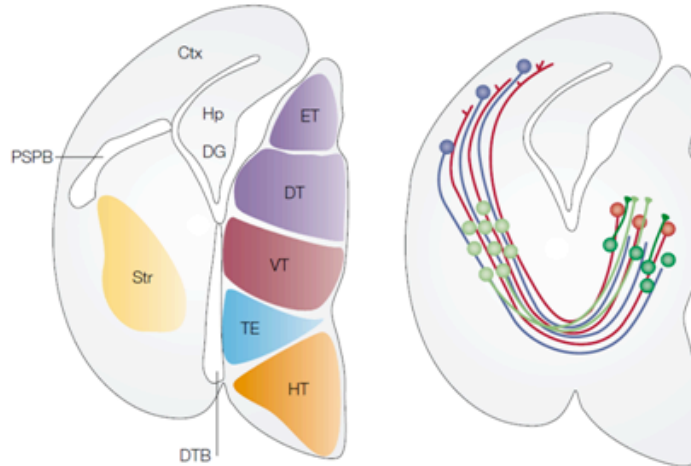
A E13.5**B E18.5**

Figura 27 Creixement dels axons corticotalàmics i talamocorticals en el cervell embrionari. Els TCA i els CTA han de viatjar per diferents regions cerebrals. A) A E13.5 els axons talàmics (línies vermelles) marxen del tàlem dorsal (DT) descendent per les cèl·lules talàmiques ventrals (verd fosc) i creuen el DTB. Llavors s'estenen travessant la MGE i la LGE. Les cèl·lules localitzades en la IC i en el RTN (cercles verd clar i fosc, respectivament) i les seves projeccions (línies verdes) tenen una íntima relació amb les projeccions talàmiques que van cap a l'escorça. Al mateix temps, els axons corticofugals (línies blaves) marxen de l'escorça i tenen un temps d'espera en el PSPB. B) A E18.5, ambdós projeccions s'estan aproximant a les seves dianes. Els axons talàmics es troben principalment en la IZ i la SP de l'escorça. Els axons corticofugals han arribat al tàlem dorsal de forma topogràficament organitzada. Ctx: escorça cerebral, DG: gir dentat, ET: epitàlem, Hp: hipocamp, HT: hipotàlem, LV: ventricle lateral, Str: estriat, TE: eminència talàmica, VP: pal·li ventral, VT: tàlem ventral. Adaptat de [292].

Un aspecte important del desenvolupament de les connexions entre el tàlem i l'escorça és la velocitat de creixement dels TCA. Durant el desenvolupament, els axons han de controlar la velocitat de creixement per poder seguir les trajectòries apropiades i per establir les connexions específiques. S'ha vist que els TCA viatgen molt més ràpid a través del telencèfal ventral que dintre de l'escorça, a més a més quan es van apropant a ella la velocitat va disminuint. Aquest mecanisme de control de la velocitat

de creixement és intrínsec del tàlem, concretament s'ha vist que la regulació d'aquesta velocitat ve donada per l'activitat espontània del calci. El silenciament d'aquesta activitat espontània genera dues respostes, d'una banda fa que els axons viatgin més lentament i d'altra banda fa que augmentin els nivells d'expressió de Robo1 gràcies al seu control transcripcional per mitjà d'un element d'unió a NFκB [295].

3.3.3 Hipòtesi "Hand Shake"

Aquesta hipòtesi és una manera d'explicar com els axons talamocorticals (TCA) ascendents viatgen cap a les regions corticals diana amb l'ajuda dels axons corticals recíprocs descendents [296].

Es basa en observacions *in vivo* que demostren una íntima relació anatòmica entre els axons talàmics que s'estan desenvolupant i els axons corticals que primer es generen [286][297]. I també en observacions *in vitro* on s'ha vist que explants de diferents regions corticals accepten innervacions de qualsevol regió del tàlem [224].

Aquesta hipòtesi sorgeix pel fet que les projeccions corticofugals primàries i les projeccions talàmiques es troben en el moment de creuar el límit pal·lial-subpal·lial (PSPB) i això genera la possibilitat de que es guïïn entre sí. Durant anys la relació entre les projeccions corticofugals i corticotalàmiques ha estat en debat, degut als resultats contradictoris que hi ha hagut en el camp. Primer, es va suggerir que aquests dos tipus d'axons es fasciculaven entre sí en la càpsula interna (IC) i en la zona intermèdia (IZ) [296][297][286], però altres estudis demostraven que viatjaven en compartiments separats [268] o que només interaccionaven en determinades regions de la seva ruta [298]. A més a més, estudis *in vitro* havien mostrat que els axons talàmics i els corticals es repel·leixen entre sí [276]. Tot i aquesta controvèrsia, estudis recents han aportat llum a aquest tema. Són estudis que miren amb molta cura els temps de desenvolupament d'aquests axons en el telencèfal ventral, regió on ambdós poblacions es troben [224].

El PSPB estableix una separació entre l'escorça en desenvolupament i l'estriat [299]. Les projeccions corticals primàries arriben i creuen el PSPB abans que les projeccions talàmiques. Els axons corticotalàmics (CTA) surten de l'escorça i a E13.5-E14.5 es

detenen en la part lateral del subpal·li fet que contrasta amb els TCA que a E13.5-E14.5 passen a través del subpal·li per arribar a l'estriat lateral. Els CTA pioners entren un dia abans al subpal·li i detenen la seva progressió durant un temps d'espera que permet als TCA arribar-hi. A l'edat que els TCA arriben a l'escorça el PSPB s'ha convertit en una regió hostil degut a una gran densitat de cèl·lules que estan migrant en la trajectòria que els TCA han de seguir [300][301][299]. Els CTA descendents interaccionen amb els TCA ascendents i els ajuden a creuar aquesta regió [297][286][302][303]. El període de descans en el subpal·li lateral és important perquè els CTA es trobin amb els TCA, ja que els TCA serveixen de guia als CTA pioners per entrar a una zona anomenada "corridor" i anar al tàlem [290]. En aquest segon temps d'espera dels axons TCA és important el paper que desenvolupen les molècules de guia axonal Sema3 i PlexinaD1. Concretament, aquestes molècules són les que generen en els axons corticals descendents la senyal de detenir-se perquè puguin trobar-se amb els axons talàmics i que aquests puguin guiar-los cap al "corridor" evitant així que preguin una trajectòria errònia [290]. Una molècula important en la interacció entre els CTA i els TCA és la proteïna Linx. Aquesta s'expressa en el "corridor" i en els axons corticofugals, però no en els axons talamocorticals. S'ha descrit que Linx intervé en la formació de la càpsula interna, tot i que no es coneix el mecanisme, i també en la guia dels axons talamocorticals. Concretament, Linx en el "corridor" promou l'extensió dels axons talàmics i quan aquests arriben al PSPB, on es troben amb els axons corticals, promou l'associació entre ells (TCA i CTA) i que els TCA s'estenguin al llarg dels CTA per entrar en l'escorça [304].

Per tant, cada cop es fa més evident la certesa d'aquesta hipòtesi en què els CTA i els TCA interaccionen entre ells per ajudar-se a arribar a la seva destinació final. Hi ha una sèrie de fets seqüencials que són la base per l'establiment de la connexió entre l'escorça i el tàlem: la migració de neurones per formar el "corridor" defineix la trajectòria dels TCA que al seu torn guien als CTA recíprocs [224].

3.3.4 Topografia de les projeccions talamocorticals

En el sistema nerviós la gran majoria de projeccions axonals s'organitzen topogràficament, és a dir, la posició de naixement determina la posició de la seva

sinapsis. El nivell d'organització de les projeccions talamocorticals constitueix un model únic per desxifrar els principals mecanismes i factors implicats en l'organització topogràfica de les connexions neuronals. En el prosencèfal mamífer la projecció topogràfica de cada nucli talàmic cap a un conjunt únic d'àrees corticals dóna lloc a la especificitat de la informació que hi entra caracteritzant així cada modalitat sensorial. La majoria de nuclis talàmics projecten cap a àrees corticals específiques proveint el primer nivell d'especificitat inter-areal de les connexions talamocorticals (**Figura 28A**) [305]. Un segon nivell d'organització s'aconsegueix dintre de cada àrea, on les projeccions de cada nucli talàmic presenten una organització topogràfica precisa intra-areal que permet la generació de representacions espaials acurades dintre de cada àrea cortical (**Figura 28B**) [305].

En la majoria d'espècies l'especificitat inter-areal de les projeccions talamocorticals s'aconsegueix en un estadi prenatal, mentre que la especificitat intra-areal té lloc en un estadi postnatal [292].

Nombrosos estudis anatòmics han proporcionat una descripció detallada de les normes de topografia bàsiques dels axons talamocorticals (TCA) en mamífers [305]

Les projeccions talàmiques s'organitzen al llarg dels eixos rostrocaudal i lateromedial de l'escorça cerebral de mamífers. Primer, al llarg de l'eix rostrocaudal, els axons originats en els nuclis talàmics rostrals projecten àrees corticals rostromedials, mentre que els nuclis talàmics caudals ho fan a àrees corticals caudolaterals (**Figura 28Ci**). Segon, al llarg de l'eix lateromedial, els axons originats en nuclis talàmics laterals tendeixen a projectar caudalment en l'escorça, mentre que els axons originats en nuclis medials projecten més rostralment (**Figura 28Cii**) [305].

Aquestes sorprenents normes simples de topografia s'apliquen a tots els nuclis talàmics i àrees corticals i són la base del patró de les projeccions talamocorticals que uneixen els nuclis talàmics amb un únic grup d'àrees corticals en mamífers, entre ells els humans (**Figura 28D**) [305].

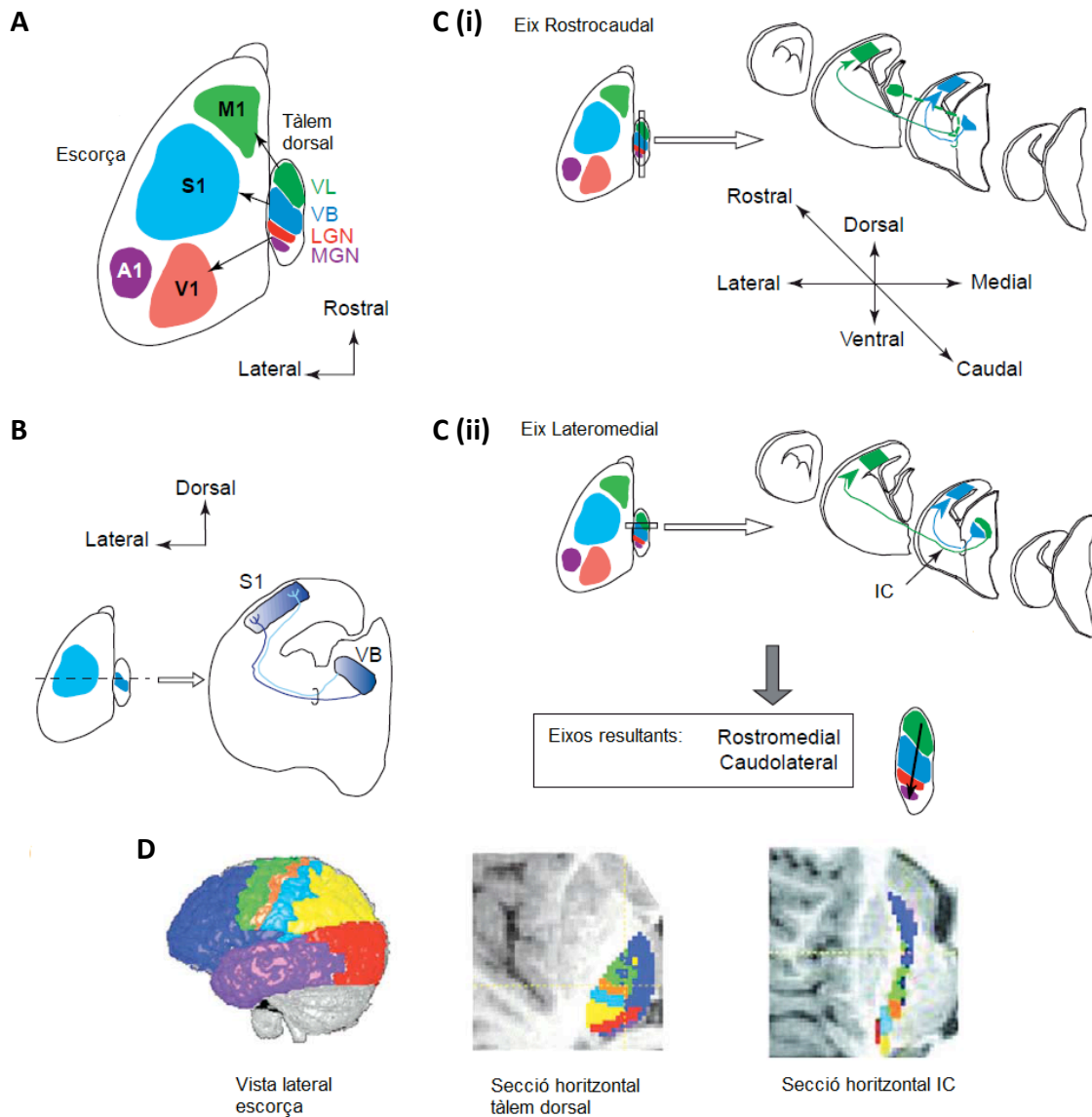


Figura 28 Topografia dels axons talamocorticals. Les connexions talamocorticals presenten diversos nivells de especificitat topogràfica. A) Primer, els axons de cadascun dels nuclis talàmics projecten cap a un únic grup d'àrees corticals (especificitat inter-areal). B) Segon, els axons projecten topogràficament dintre d'una determinada àrea cortical (especificitat intra-areal), esquematitzat aquí pel sistema somatosensorial: els axons de la part lateral del nucli somatosensorial primari (nucli ventrobasal, VB; blau clar) projecten cap a la part medial de l'àrea somatosensorial primària (S1; blau fosc), mentre que els axons de la part medial del VB (blau fosc) projecten cap a la part lateral de S1 (blau clar). C) Les projeccions talamocorticals s'organitzen a llarg dels eixos rostrocaudal i lateromedial de l'escorça cerebral de mamífers. Primer, al llarg de l'eix rostrocaudal, els axons originats en els nuclis talàmics rostrals projecten àrees corticals rostromedials, mentre que els nuclis talàmics caudals ho fan caudolateralment (i). Segon, al llarg de l'eix lateromedial, els axons originats de nuclis talàmics laterals tendeixen a projectar caudalment l'escorça, mentre que els originats en els nuclis medials ho fan més rostralment (ii). Això resulta en una organització topogràfica bàsica on l'eix rostromedial-caudolateral en

el tàlem s'assigna a l'eix rostrocaudal en l'escorça. D) Existeix la mateixa organització topogràfica en humans. Adaptat de [305].

Històricament desxifrar els mecanismes que estableixen el patró de les projeccions talamocorticals en mamífers ha estat un tema de controvèrsia, ja que alguns estudis indicaven que l'escorça contenia factors intrínsecs que determinaven el patró de l'especificitat inter-areal de les projeccions talamocorticals [306][307], altres mostraven que molècules presents en el telencèfal ventral iniciaven la topografia talamocortical [308] i altres que hi havia una independència parcial entre els mecanismes que controlen la regionalització cortical en àrees específiques i els mecanismes que iniciaven l'especificitat inter-areal dels axons talàmics [309]. El model proposat per Vanderhaeghen i Polleux pretèn englobar totes aquestes dades en un model simple en què plantegen que la topografia precisa de les projeccions talàmiques que surten d'un determinat nucli i van cap a una única àrea cortical està especificada seqüencialment per mitjà d'aquests passos: i) Molècules extracorticals presents en el telencèfal ventral inicien la guia topogràfica dels axons talàmics cap a uns dominis corticals definits (frontal, parietal, temporal i occipital). ii) Molècules corticals juguen un paper fonamental en la última selecció que els axons talàmics fan per escollir l'àrea cortical apropiada. iii) Molècules corticals i mecanismes dependents d'activitat controlen la posició final intra-areal dels axons talàmics dintre de la seva àrea cortical diana [305]. Dues de les molècules extracorticals presents en el telencèfal ventral, en una regió anomenada "corridor", són Slit i Netrin. Aquestes tenen una expressió gradual sent alta en la part rostral i baixa en la part caudal. La combinació d'ambdues, però no cadascuna d'elles per separat, té la capacitat d'atreure els axons talàmics rostrals cap a posicions rostrals de l'escorça i repel·lir els axons talàmics intermedis perquè segueixin una trajectòria intermèdia cap a la zona intermèdia de l'escorça cerebral [223]. El mecanisme molecular d'aquest procés és desconegut i és part de l'estudi d'aquesta tesi. Les molècules EphA4 i EfrinaA5 estan implicades en la determinació inter-areal de les connexions talamocorticals. Aquesta determinació comença en estadis embrionaris primerencs en el telencèfal ventral. EphA s'expressa en el tàlem dorsal en forma de gradient, alt rostromedial i baix caudolateral. EfrinaA5 s'expressa en forma de gradient complementari, alt caudal i baix rostral, en el

telencèfal ventral. Els axons talamocorticals de la part rostromedial del tàlem que expressen alts nivells d'EphA4 viatgen a través de la part rostral del telencèfal ventral, que expressa nivells baixos de EfrinaA5, i envaeixen la part rostral de l'escorça. Els axons de les parts més caudolaterals del tàlem viatgen més caudalment a través del telencèfal ventral i envaeixen dominis corticals més caudals [310]. Curiosament, aquestes dues molècules també intervenen en la determinació de la posició intra-areal dels axons talamocorticals. En estadis postnatsals s'expressen en forma de gradients complementaris en el nucli talàmic VB (ventrobasal) i en S1 (àrea somatosensorial primària), tenint EfrinaA5 expressió elevada en S1 i poca expressió en VB i EphA4 a l'invers. Aquests gradients estableixen la topografia dels axons VB cap a S1, la part medial de VB projecta a la part lateral de S1 i la part lateral de VB projecta a la part medial de S1. En EphA4/EfrinaA5 doble mutant els axons de la part medial de VB envia projeccions a dominis medials de S1. Aquests resultats indiquen la implicació d'aquestes dues molècules en la topografia intra-areal dels axons talamocorticals [305].

3.3.5 Formació del "corridor". Regió instructiva pels TCAs

Estudis recents han mostrat que el telencèfal ventral a part de contenir informació topogràfica, funciona com a centre de guia pels axons talamocorticals (TCA) degut a la formació de passadissos neuronals específics anomenats "corridors". Concretament s'ha demostrat l'existència d'un "corridor" que obre un camí permissiu en el telencèfal ventral que actua com a mecanisme de guia pels TCA (**Figura 29**) [133].

Aquest treball [133], on es demostra l'existència del "corridor", mostra que el desenvolupament de les projeccions talamocorticals depèn de la migració tangencial d'una població de neurones que deriven del telencèfal ventral i il·lustra perfectament com la migració neuronal i la guia axonal estan coordinades en el temps i en l'espai per un desenvolupament correcte del sistema nerviós. Aquesta migració tangencial contribueix a l'establiment d'una regió permissiva que és essencial perquè els TCA trobin la ruta que han de seguir per arribar a l'escorça. Aquesta regió està formada per una subpoblació d'interneurones GABAèrgiques que s'originen en la zona ventricular (VZ) de l'eminència ganglionar lateral (LGE) i migren tangencialment pel telencèfal

ventral entre E11.5-E12.5 per establir-se entre el globus pàl·lid (GP) i la zona proliferativa de l'eminència ganglionar medial (MGE). L'arribada d'aquestes cèl·lules obre un territori permissiu pel creixement dels TCA en la zona del mantell de la MGE entre territoris que deriven de la MGE no permissius (**Figura 29**). Aquestes neurones s'anomenen neurones del "corridor" i es poden identificar per l'expressió específica de factors de transcripció de la LGE: Islet1, Ebf1 i Meis2.

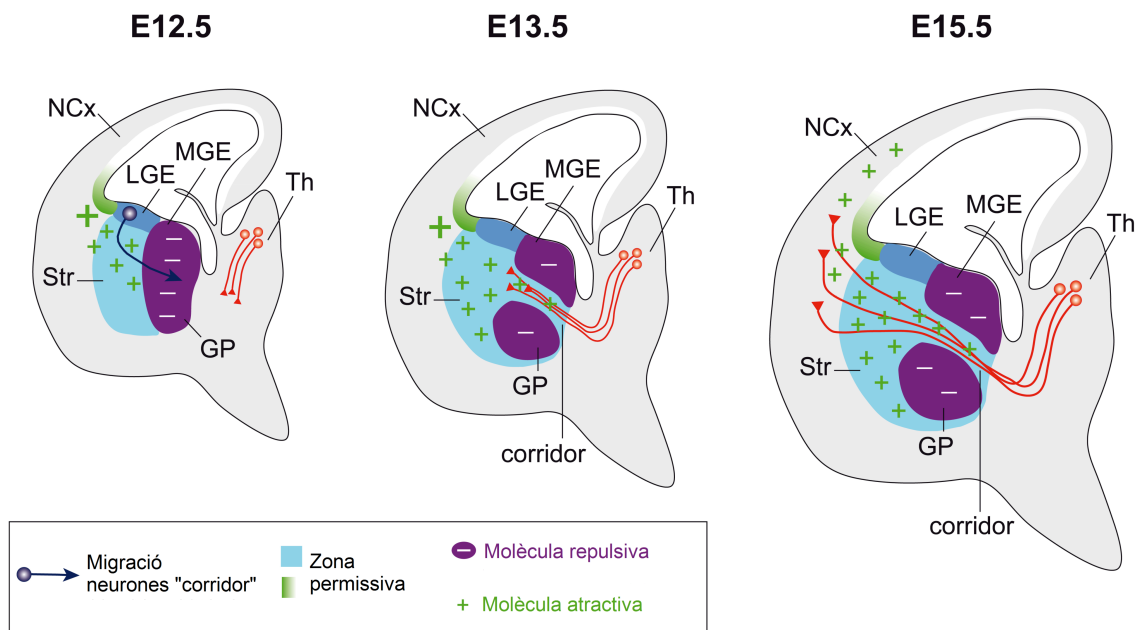


Figura 29 Formació del "corridor" neuronal en el telencèfal ventral. Representació de com els TCA són guiats cap a l'escorça gràcies a la migració tangencial de les cèl·lules del "corridor" que expressen molècules d'atracció. Una població de neurones GABAèrgiques de la LGE migren tangencialment cap a la part medial del cervell i formen un "corridor" en la MGE, a E12.5, (línia blava) abans de que els TCA entrin al telencèfal. En aquesta primerenca edat, la MGE és un territori no permissiu pels TCA (àrea violeta). Aquestes neurones que deriven de la LGE colonitzen el mantell de la MGE a E13.5 i formen un espai permissiu pels TCA en aquesta regió. L'expressió de molècules atractives (Neuregulina-1-Ig) que s'expressen en aquesta regió (+ verd) i les que provenen de l'escorça (àrea verda) (Neuregulina-1-CRD) contribueixen a la guia dels TCA. NCx: escorça en desenvolupament, LGE: eminència ganglionar lateral, MGE: eminència ganglionar medial, Th: tàlem, Str: estriat i GP: globus pàl·lid. Adaptat de [133].

A més a més, aquest treball també demostra que dos productes diferents del gen Neuregulina1 (Nrg1), CRD-NRG1 i Ig-NRG, intervenen en la guia dels axons talamocorticals en el telencèfal ventral. El producte CRD-NRG1 s'expressa per les interneurons que formen el "corridor" i el producte Ig-NRG1 és alliberat per neurones

de l'escorça cerebral [133].

Posteriorment, es va descobrir que durant el desenvolupament i evolutivament la molècula Slit2 orienta la migració d'aquestes neurones del "corridor" i canvia la trajectòria dels axons talàmics d'una posició externa a una posició interna específica de mamífers. En ratolí les neurones del "corridor" expressen Robo1 i Robo2. D'aquesta manera, Slit2 genera una resposta de repulsió des de la part ventral de la MGE i l'àrea preòptica (PoA) que controla el posicionament de les neurones del "corridor" mitjançant la seva senyalització a través de Robo1 i Robo2 [311].

3.3.6 Guia axonal dels axons talamocorticals

Mentre els axons talàmics travessen el pre-tàlem, a E11-E13 en ratolí, creixen en direcció a l'hipotàlem fins que giren lateralment per entrar a la càpsula interna (IC), prop del límit diencèfal-telencèfal (DTB). L'hipotàlem expressa alts nivells de Slit, explants d'hipotàlem repel·leixen els axons talàmics en cultius d'explants i en mutants Slit1^{-/-} i Slit1-2^{-/-} la majoria d'axons talàmics no poden entrar al telencèfal i descendeixen en l'hipotàlem [312][285][238][241][223]. Aquestes troballes aporten evidència de que els axons talàmics, que expressen Robo, es desvien i s'allunyen de l'hipotàlem per creuar el DTB degut a la repulsió induïda per Slit.

Després d'entrar en el telencèfal, es troben dintre del "corridor" qui constitueix un territori permissiu pel creixement intern dels axons talamocorticals (TCA) a través de cèl·lules derivades de l'eminència ganglionar medial (MGE), les quals no són permissives per ells. Les neurones del "corridor" expressen un producte de la Neuregulina1 que està ancorada a la membrana, mentre que els axons talàmics expressen el seu receptor, ErbB4. És aquesta senyalització qui regula la trajectòria dels TCA a través d'aquesta regió [133].

El subpal·li atreu els axons talamocorticals i també els corticofugals i constitueix una diana intermèdia per aquestes projeccions [313][312][293]. Anàlisis de ratolins mutants per molècules de guia axonal i els seus receptors han implicat a Netrin1, Slit1 i Slit2, Robo1 i Robo2 i Sema6A en la guia dels TCA a través del subpal·li [314][285][315][238][241][316][317]. Mentre els TCA viatgen internament a través del

subpal·li, divergeixen rostrocaudalment en forma de ventall per poder arribar a les diferents àrees corticals. La diversificació dels TCA prèviament segregats en la IC està produïda per contragradients de diversos sistemes de lligand-receptor que s'expressen en els TCA i en les cèl·lules del telencèfal ventral. Les molècules identificades en aquest procés són EfrinaA/Eph, Netrin1/DCC/Unc5, Sema3/Neuropilines i L1-CAM (CHL1 i NrCAM) (Figura 30) [305].

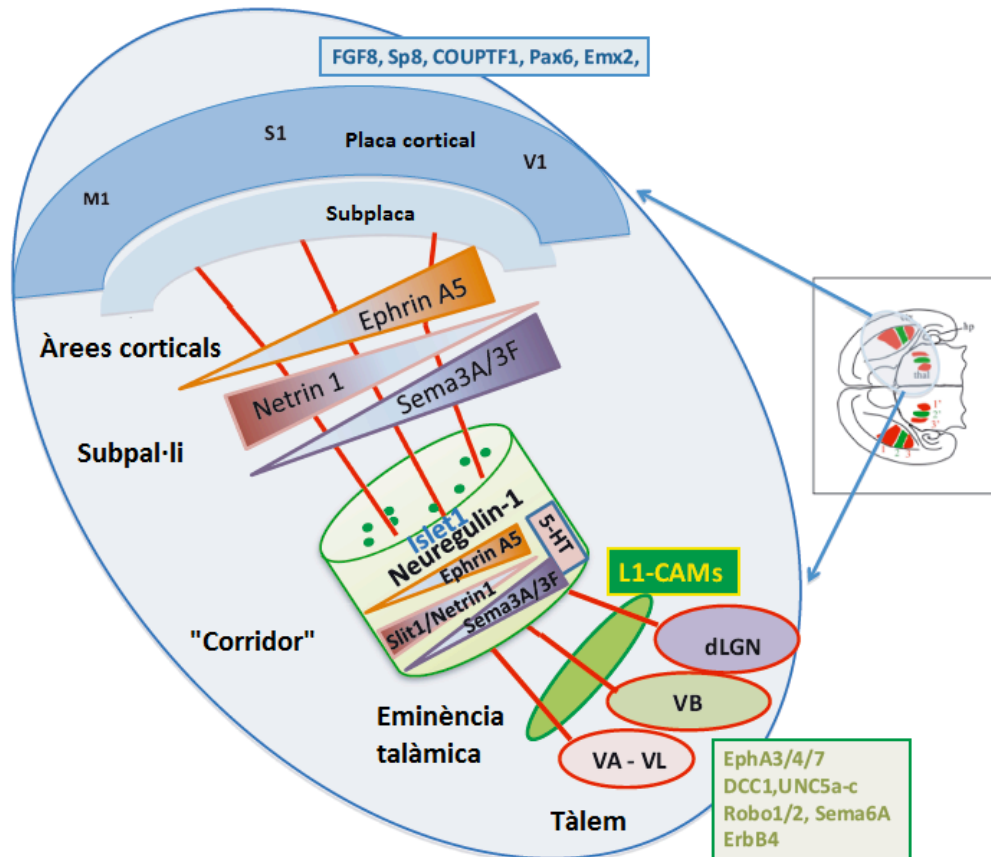


Figura 30 Esquema de les trajectòries dels axons talamocorticals des del nucli talàmic a través del telencèfal ventral fins les diferents àrees corticals. Hemisferi de la part dreta que il·lustra alguns dels mecanismes moleculars que estan implicats en la guia axonal dels axons talamocorticals a través de l'eminència talàmica, el "corridor" i el subpal·li per arribar a les zones apropiades de l'escorça. Els TCA dels diferents nuclis talàmics surten per l'eminència talàmica i són diversificats dintre del "corridor" (cèl·lules Islet-1 positives), que es troba en el subpal·li, al llarg de l'eix rostrocaudal. Dintre del "corridor" els TCA expressen diferents combinacions de receptors de guia axonal (requadre verd extrem dret) i són guiats per gradients de molècules de guia axonal atractives i repulsives (EfrinaA5, Netrin-1, Sema3A, Sema3F i Slit) i influenciats per Neuregulina-1 i serotonina (5-HT). El subpal·li, a excepció de Slit, s'expressen gradients similars. Alguns dels gradient que es troben en la subplaca cortical FGF8, Sp8,

COUTF1, Pax6 i Emx2. Adaptat de [291].

EfrinaA5/EphA estan implicats en que els axons provinents del nucli ventrolateral (VL) arribin a l'escorça M1. Els TCA en el tàlem rostral expressen alts nivells de EphA4 i EphA7 i són repel·lits pel gradient, alt caudolateral i baix rostromedial, d'EfrinaA5 expressat en el subpal·li [310][318][319]. Netrin-1 ajuda en aquest procés d'una banda atraient els axons rostrals i d'altra repel·lint els axons caudals. Aquestes respostes oposades es deuen als nivells d'expressió de DCC i d'Unc5 en els TCA i la modulació per serotonina [314][316]. L1-CAM intervé en respostes de repulsió als gradients d'EfrinaA i de Sema3. CHL1 normalment s'uneix a Neuropilina1 per promoure la repulsió induïda pel gradient, alt caudal, de Sema3A en el telencèfal ventral sobre els TCA intermedis i que aquests puguin arribar correctament a l'escorça S1. NrCAM juntament amb Neuropilina2 estan implicats en dirigir els axons rostrals cap a l'escorça M1 [320][321]. NrCAM s'associa amb Neuropilina2 i intervé en la repulsió induïda per Sema3F, qui s'expressa en un gradient alt caudal en el subpal·li [322]. Sema6A permet que els axons provinents del nucli caudal del tàlem, nucli geniculat lateral dorsal (dLGN), girin en el telencèfal ventral per poder entrar en l'escorça **(Figura 30)** [315].

Tot i que les molècules de guia axonal inicialment es va proposar que actuaven principalment en l'estriat, diversos experiments van revelar que les neurones del "corridor" probablement actuaven conjuntament amb les de l'estriat per orientar els axons talamocortical al llarg de l'eix rostrocaudal, ja que diverses molècules de guia axonal també s'hi expressaven [311]. L'anàlisi del mutant per Slit i per Robo1 i Robo2 van confirmar l'expressió localitzada de molècules de guia axonal en el "corridor" era important per orientar la trajectòria dels axons intermedis i rostrals, indicant així que aquestes neurones a part de participar en la migració interna dels TCA també intervé en la formació de la seva topografia característica en forma de ventall dintre de la diana intermèdia **(Figura 30)** [311][223].

Encara que el subpal·li controli la guia primerenca dels axons talamocorticals, la regionalització cortical, que és controlada pel morfogen FGF8 i per factors de transcripció (Pax6, COUP-TF1, Emx2 i Sp8), és suficient per reorientar el mapa talamocortical dintre de l'escorça **(Figura 30)** [309][323][324].

OBJECTIUS

En el moment d'iniciar la present tesi doctoral, es coneixia molt poc sobre els mecanismes de senyalització intracel·lular per sota de les proteïnes FLRT, especialment en la funció neuronal. De fet, els processos més importants descrits fins a aquell moment, relacionats amb FLRTs en neurones tenien lloc de manera no intrínseca, considerant els FLRTs com a lligands per a receptors específics com per exemple els Unc5. No obstant, les proteïnes FLRT tenen una regió citoplasmàtica molt ben conservada en vertebrats i amb un alt grau d'homologia entre FLRT1, FLRT2 i FLRT3. Per tant, la nostra hipòtesi de partida era que la part intracel·lular dels FLRTs era competent per induir senyalització intracel·lular i que aquesta senyalització seria important per la funció del sistema nerviós. Sota aquesta hipòtesi, l'objectiu general del meu projecte de Tesi era la identificació de mecanismes moleculars de senyalització intracel·lular de les proteïnes FLRT en neurones i avaluar la possible funció d'aquesta interacció *in vivo*. Per tal de poder aconseguir aquest objectiu ens vàrem centrar en la funció de FLRT3 i vàrem treballar per assolir els següents objectius concrets:

1. Trobar noves proteïnes d'interacció amb el domini intracel·lular dels FLRT per tal de conèixer les vies de senyalització activades per aquestes proteïnes. Per això es va dur a terme un "screening" per Doble Híbrid utilitzant com a "bait" el domini intracel·lular de FLRT3 i diverses llibreries de cDNA del sistema nerviós.
2. Caracteritzar gens candidats, seleccionar els més interessants, comprovar la seva interacció en cèl·lules i en teixit i identificar els dominis d'unió i els mecanismes moleculars que desencadena.
3. Descriure la funcionalitat biològica d'aquestes interaccions, *in vivo*, sobretot durant el desenvolupament del sistema nerviós, en aspectes de guia axonal i/o migració neuronal.

MATERIAL I MÈTODES

1. Doble híbrid

Es va utilitzar el sistema de Clontech: protocol No. PT3183-1 i versió No. PR6Y2132. La proteïna que es va estudiar era el domini intracel·lular (ICD) de FLRT3, de l'aminoàcid 553 fins el 649, i la llibreria que es va usar era una llibreria de cDNA de cervell fetal humà.

El ICD de FLRT3 estava expressat com a producte de fusió amb Gal4 DNA-BD en la soca de llevat AH109 (MATa). El vector que contenia el ICD de FLRT3 tenia el gen TRP1 que codifica per un enzim necessari en la síntesis de triptòfan. La llibreria de cervell fetal humà *MatchmakerTM Pretransformed Library* normalitzada que estava expressada com a producte de fusió amb Gal4 AD en la soca de llevat Y187 (MAT α). El vector que contenia la llibreria de cDNA tenia el gen LEU2 que codifica per un enzim necessari en la síntesis de leucina.

Es van ajuntar els cultius de les dues soques, respectivament transformades, durant 20 hores a 30°C i amb una agitació de 30rpm, tot seguint el protocol de Clontech. Durant aquest temps es van formar cèl·lules diploides que tenien quatre gens reporters: HIS3, ADE2, MEL1 i LacZ que eren activats el cas que es donés interacció entre el ICD de FLRT3 i una proteïna codificada pel cDNA de la llibreria. Després d'aquestes hores el cultiu es va sembrar en plaques de medi mínim SD -Ade, -His, -Trp, -Leu. Les plaques es van incubar a 30°C i durant 11 dies, les colònies que van aparèixer, es van anar ressemblant en plaques SD -Ade, -His, -Trp, -Leu. Les colònies obtingudes es van ressemblar en plaques SD -Ade, -His, -Trp, -Leu, +X α Gal (X α Gal a 0,4mg/mL 559761, MPBiomedicals) per confirmar la interacció. Paral·lelament es va determinar l'eficiència que hi havia hagut en la formació de diploides (eficiència del "mating"). Per analitzar això es van fer unes dilucions seriades (1:100, 1:1000 i 1:10000) a partir d'aquest cultiu que contenia les cèl·lules diploides i es van sembrar 100 μ L de cadascuna de les dilucions en plaques amb medi SD -Trp, SD -Leu i SD -Trp, -Leu. Després de 3-4 dies a 30°C es van comptar el nombre de colònies que havien aparegut: el nombre de ufc/mL de les plaques SD-Trp va donar la viabilitat de la soca que

contenia la proteïna a estudiar, el nombre de ufc/mL de les plaques SD-Leu va donar la viabilitat de la soca que contenia la llibreria de cDNAs i el nombre de ufc/mL de les plaques SD-Trp,-Leu va donar la viabilitat de les cèl·lules diploides. La soca que va tenir menys viabilitat es va establir com a parella limitant. Amb la següent fórmula es va calcular l'eficiència del "mating" (percentatge de diploides):

$$\% \text{ diploides} = \frac{\text{Nombre de ufc/mL de diploides}}{\text{Nombre de ufc/mL de la parella limitant}} \times 100$$

Per saber quins eren els clons que s'havien trobat, primer de tot, es va extreure el DNA d'aquestes colònies positives. Per extreure el DNA primer es va resuspendre una lletia de cèl·lules amb 25µL aigua, després mitjançant "glass beads" i tres cicles de 45 segons a una velocitat de 5,5 en el Ribolyzer (FastPrep®-24) es van trencar les cèl·lules i finalment amb una centrifugació de 5 minuts a 12000rpm es van separar les "glass beads" i restes cel·lulars de la suspensió que contenia el DNA. Després, i a partir d'aquest DNA, es va amplificar el cDNA del vector de la llibreria mitjançant PCR. Els "primers" que es van utilitzar són: 5'-CTATTCGATGATGAAGATACC- i 3'-AGATGGTGCACGATGCACAG-. I per últim es van seqüenciar tots els DNAs amplificats amb el "primer" 5'- CTATTCGATGATGAAGATACC.

Les seqüències obtingudes es van analitzar amb la base de dades BLAST per estudiar si pertanyien a la seqüència codificant (CDS) del gen i si estaven en pauta amb Gal4 DNA-BD.

2. Cultiu i Transfecció de la línia HEK293T

Les cèl·lules HEK293T es van cultivar en plaques de 100mm i amb medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) complementat amb 10% FBS (10270, GIBCO Life Technologies) i 1% penicil·lina/estreptomicina (15140, GIBCO Life Technologies) (concentració final 100 U/mL P; 100 µg/mL S). Pels experiments en què s'havien de transfectar es van plantar en plaques tractades prèviament amb col·lagen. Aquest tractament de la superfície de la placa amb col·lagen es va fer amb una solució que conté àcid acètic 0,02N i col·lagen de cua de rata Tipus I (354236, BD Bioscience) a 1mg/mL i que es deixa durant tota la nit (O/N). Després de 12-15 hores d'haver-les

plantat es van transfectar amb diferents combinacions de DNA. De manera rutinària es va fer una transfecció en paral·lel amb pEGFP per monitoritzar l'eficiència i només els experiments amb un percentatge de cèl·lules transfectades de >60% es van continuar. Totes les transfeccions es van fer seguint el mètode següent: en un tub A es va preparar els X µg de DNA + els X mL d'optiMEM (31985-047, Gibco Life Technologies) i en un tub B es va preparar els X µL de PEI (PEI = 10 x µg de DNA) (polyethylenimin cat. 40872-7, SIGMA) + els X mL d'optiMEM (**Taula 1**). Posteriorment es va afegir el tub B dintre del tub A, es va vortejar la barreja durant 2-5 segons a 1800rpm i es va deixar reposar 10 minuts a temperatura ambient. Durant aquests 10 minuts es va fer un rentat amb optiMEM a les cèl·lules que s'havien de transfectar. Un cop passat aquest temps i fet el rentat es va afegir la barreja A+B i els X mL d'optiMEM a les cèl·lules i es van deixar les plaques a l'incubador durant 1 hora (**Taula 1**). Després d'aquesta hora es va aspirar la solució que hi havia en les plaques i es va posar medi DMEM complementat amb 10% FBS i 1% penicil·lina/estreptomicina.

Diàmetre placa	Cèl·lules plantades per placa	µg de cada DNA per transfecció	µL d'optiMEM en tub A	µL de PEI en tub B	µL d'optiMEM en tub B	µL d'optiMEM final
24mm	100000	0,5	50	5	50	145
60mm	1100000	4	600	40	600	1500

Taula 1 Relació diàmetre placa - cèl·lules plantades - transfecció.

3. Cultiu primari de neurones rostrals del tàlem

S'han utilitzat femelles CD1 amb embrions d'estadi embrionari E13,5 (es considera 0,5 el dia que s'observa el tap vaginal) que es van anestesià amb ketamina/xylacina (100/10mg/kg, intraperitoneal) i es van sacrificar mitjançant dislocació cervical. Els embrions es van extreure de l'úter i del sac embrionari i es van decapitar. Ràpidament, els caps es van col·locar en la solució de dissecció, HBSS (1X) +CaCl₂/MgCl₂ (24020-091, GIBCO Life Technologies).

D'aquests caps es va extreure el tàlem rostral que es va dissociar, primerament amb un bisturí, després es va fer passar el teixit unes 30 vegades per una punta de 1mL i per últim per una punta de 200µL. La suspensió es va centrifugar 3 minuts a 700rpm per eliminar les restes de les cèl·lules mortes i el sobrenedant es va portar al volum final necessari amb el medi de cultiu (Neurobasal (-) L-glutamina (21103-049, GIBCO Life Technologies), 2mM L-glutamina (25030-014, GIBCO Life Technologies), 1X B27 (12586-010, GIBCO Life Technologies), 1mM MEM piruvat de sodi (11360-039 GIBCO Life Technologies) i 100 U/mL Penicil·lina; 100 ug/mL Estreptomicina) per ser plantat en totes les plaques que prèviament s'havien tractat amb poly-D-lisina/laminina (**Taula 2**). El tractament de les plaques amb poly-D-lisina i laminina es va fer de la següent manera: es va preparar una solució de 0,5mg/mL de poly-D-lisina (P7886, SIGMA) amb aigua destil·lada i es va cobrir la superfície de les plaques amb aquesta solució i es van incubar O/N en l'incubador a 37°C i 5% CO₂. Al dia següent es va aspirar i es va afegir la laminina (23017-015, Invitrogen) a una concentració final de 5µg/mL dissolta en Neurobasal, fins cobrir la superfície. Aquesta es va incubar durant un mínim de 4 hores en l'incubador a 37°C i 5% CO₂.

Diàmetre placa	Tàlems
24mm	½
35mm	2
60mm	5
100mm	15

Taula 2 Relació nombre de tàlems plantats per placa. Per tenir una densitat del 70-80% en cada placa es van extreure el nombre total de tàlems expressats en la taula, segons el diàmetre de la placa. Per exemple, per una placa de 35mm es necessitaven dos tàlems, els quals es van dissociar junts i es van resuspendre amb un volum de 2mL amb medi de cultiu. En termes generals, després de la dissecció, els tàlems es van ajuntar tots i es van dissociar conjuntament i es van resuspendre amb el volum final que depèn del nombre de plaques que es necessiten.

4. Co-immunoprecipitació

4.1 In vitro

En aquest assaig de co-immunoprecipitació *in vitro* es va incubar durant 1 hora en l'agitador orbital (cod. 3003011, SelectaP) les següent combinacions de proteïnes recombinants: 1µg de FLRT3-Fc +/- 1µg de Netrin-1 o 1µg de Unc5B-Fc +/- 1µg de Netrin-1, totes dissoltes amb 300µL de PBS. Passat aquest temps, totes les combinacions es van incubar amb 20µL de la resina de níquel, NI-NTA (040902, Invitrogen Life Technologies), durant 2,5 hores en l'agitador orbital. Finalment, es van fer tres rentats amb 1mL de PBS i es van resuspendre en tampó de càrrega (Laemmli buffer: 0,4% SDS, 10mM Tris pH6.8, 0,04mg/mL bromophenol blue, 20mM DTT i 10% glicerol).

4.2 En cèl·lules HEK293T

Passades 24 hores després de la transfecció, es van llisar les cèl·lules en fred amb tampó de lisis fred (150mM NaCl, 10% glicerol, 20mM Tris pH7.4, 1% Tritó X-100, 1mM Na₃VO₄, 1mM EDTA, 2mM Benzamidina, còctel d'inhibidors de proteases *Complete EDTA-free* (11 873 580 001, Roche), 5mM NaPP i 5mM NaF). El llisat es va recollir en un tub tipus Eppendorf, es va incubar 30 minuts l'agitador orbital i es va centrifugar 5 minuts a 13000rpm a 4°C per separar les restes cel·lulars de la fracció de proteïnes solubilitzades. El sobrenedant de cada condició es va incubar durant 3,5 hores a 4°C i en l'agitador orbital amb 10µL de la resina ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel (A2220, SIGMA) o de la resina anti-HA (A-2095, SIGMA), segons l'experiment. En alguns casos es van utilitzar 1,5µg de l'anticòs anti-FLRT3 (AF2795, R&D Systems); aquest es va incubar durant 1 hora amb el sobrenedant en les mateixes condicions i posteriorment es va afegir 10µL de la resina nProtein A Sepharose[™] + Protein G Sepharose[™] (17-6002-35, GE Healthcare) i es va incubar durant 2,5 hores més. Totes les resines es van rentar prèviament amb tampó de lisis. Després d'aquest temps, els immunoprecipitats es van rentar tres vegades amb 1mL de tampó de lisis i es van resuspendre finalment en tampó de càrrega.

4.3 En cultius primaris

La co-immunoprecipitació en neurones de tàlem rostral en cultiu es va dur a terme

després de dos dies en cultiu (2DIV). Després del tractament corresponent, si era el cas, les neurones es van rentar amb tampó PBS (1,37M NaCl, 26,8mM KCl, 14,7mM KH_2PO_4 , 64,6mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) i es van lliurar en fred amb tampó de lisis fred (25mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA, 0,1% SDS i còctel d'inhibidors de proteases *Complete EDTA-free*). Els lliurats es van sonicar i es van centrifugar 5 minuts a 12000rpm, el sobrenedant resultant es va incubar amb 1,5 μg de l'anticòs anti-FLRT3 (AF2795, R&D Systems) o 5 μg de l'anticòs anti-Robo1 (ab7279, Abcam) durant 1 hora a 4°C en l'agitador orbital. Posteriorment es va afegir 20 μL de la resina nProtein A SepharoseTM + Protein G SepharoseTM, prèviament rentada amb tampó de lisis, i es va incubar durant 2,5 hores més. Després d'aquest temps, els immunoprecipitats es van rentar tres vegades amb 1mL de tampó de lisis i es van resuspendre en tampó de càrrega.

Abans d'afegir l'anticòs als lliurats totals, aquests es van quantificar amb el mètode Bradford per tal de saber la proteïna total de cada condició experimental. Després de la quantificació els mateixos μg de proteïna es van incubar amb els diferents anticossos, contra FLRT3 i contra Robo1.

La immunoprecipitació amb l'anticòs contra FLRT3 es va optimitzar per tal d'obtenir la màxima quantitat de Robo1 que co-immunoprecipités. Es van fer proves per tal d'obtenir un tampó de lisis òptim pels nostres objectius, ser capaços de co-immunoprecipitar el màxim de Robo1. Per això, vam fer diferents tampons de lisis canviant la concentració de NaCl, de més a menys astringència, i finalment la concentració que va donar un millor resultat va ser la de 25mM. També vam fer diferents tampons de lisis canviant la concentració de detergent i vam passar d'utilitzar Tritó-X100 a SDS, ja que aquest últim solubilitzava més quantitat de Robo1. Per tant, finalment vam utilitzar un tampó de lisis que contenia 25mM de NaCl i 0,1% de SDS.

5. Assaig de biotinització

Passades 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules es van rentar amb PBS fred i es van incubar amb 1mg/mL de EZ-LinkTM Sulfo-NHS-SS-Biotina (21331,

ThermoScientific) en fred en un agitador (Heidolph Unimax 1010) durant 30 minuts. L'excés de biotina va ser eliminat rentant dues vegades amb 50mM NH₄Cl dissolt en PBS. Finalment, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van lliurar amb el tampó de lisis (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1,25% Tritó X-100, 0,25% SDS i còctel d'inhibidors de proteases *Complete EDTA-free*). Els lliurats es van centrifugar 5 minuts a 13000rpm a 4°C i es van incubar durant 3 hores a 4°C en l'agitador orbital amb 20µL de la resina Estreptavidina (20347, ThermoScientific) i passat aquest temps es van fer tres rentats amb el tampó de lisis i es van resuspendre en tampó de càrrega.

6. Assaig amb Fosfatasa Alkalina (AP)

Passades 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules es van rentar amb PBS en fred i es van incubar durant 90 minuts amb el medi condicionat que contenia Netrin-AP o SEAP com a control. Passat aquest temps es va rentar amb TBS (20mM Tris pH8 i 120mM NaCl) i amb el tampó de marcatge de l'AP (100mM Tris pH9.5, 100mM NaCl i 5mM MgCl₂). Posteriorment les cèl·lules es van incubar durant 1 hora amb el substrat de la fosfatasa alcalina, FASTTM FAST RED/NAPHTHOL (F-0900, SIGMA), dissolt en tampó de marcatge de l'AP. Una pastilla de substrat es dissol en 10mL i es filtra amb un poro de 45µm. Finalment, les cèl·lules es van fixar amb 4%PFA en PBS i es van pendre les imatges en un microscopi òptic.

7. Immunofluorescència

7.1 En cèl·lules HEK293T i cultius primaris

A les 24 hores de la transfecció les cèl·lules es van fixar durant 20 minuts amb una solució freda de 4% de paraformaldehid en PBS. A continuació es van rentar amb PBS i es van permeabilitzar i bloquejar al mateix temps incubant-les amb una solució de PBS + 0,2% Tween-20 i 4% Donkey sèrum durant 30 minuts. Els anticossos primaris i secundaris es van diluir a la concentració pertinent en una dilució 1:10 de la solució de permeabilització + bloqueig (**Taula 3 i 5**). Generalment, l'anticòs primari es va incubar durant 1 hora i el secundari durant 30 minuts a temperatura ambient, dependent de l'anticòs aquest temps era diferent. Després de cada incubació, es van fer tres rentats

amb PBS i els cobreobjectes es van muntar amb SlowFadeGold S36936 d'Invitrogen. Les imatges es van prendre amb el microscopi confocal OLIMPUS FV1000.

7.2 Doble immunofluorescència en cultius primaris

A les 24 hores de la transfecció les cèl·lules es van fixar durant 20 minuts amb una solució freda de 4% de paraformaldehid en PBS. Per la primera immunofluorescència, es van rentar amb PBS i es van bloquejar incubant-les amb una solució de PBS + 4% Donkey sèrum durant 30min. Els anticossos primaris i secundaris es van diluir a la concentració pertinent (**Taula 3 i 5**) en una dilució 1:10 de la solució de bloqueig. Generalment, l'anticòs primari es va incubar durant 1 hora i el secundari durant 30 minuts a temperatura ambient, dependent de l'anticòs aquest temps era diferent. Després de cada incubació, es van fer tres rentats amb PBS i es van permeabilitzar i bloquejar al mateix temps abans de començar amb la segona immunofluorescència. Per això es van incubar amb una solució de PBS + 0,2% Tween-20 i 4% Donkey sèrum durant 30min i posteriorment es van incubar amb els anticossos primaris i secundaris diluïts a la concentració pertinent (**Taula 3 i 5**) en una dilució 1:10 de la solució de permeabilització + bloqueig. Després de cada incubació es van fer tres rentats amb PBS. Els cobreobjectes es van muntar amb SlowFadeGold (S36936, Invitrogen) i les imatges es van prendre amb el microscopi confocal OLIMPUS FV1000.

8. Western-blot

Els extractes proteics dels llisats i immunoprecipitats es van resoldre mitjançant electroforesis SDS-PAGE amb el següent tampó a pH8.9: 0,25M Tris, 1,92M glicina i 10% SDS. La transferència de les proteïnes a les membranes de PVDF es va fer en semisec (300V, HoeferTM TE77 semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences) utilitzant tampó de transferència pH8.3 (48mM Tris, 39mM glicina, 0,0375% SDS i 5% MeOH). Les membranes es van bloquejar amb 5% de llet en pols descremada diluïda en TBST (10mM TRIS-HCl pH8, 150mM NaCl i 0,1% Tween-20) durant 45 minuts a temperatura ambient en agitació. Els anticossos primaris que es van incubar O/N a 4°C en agitació. Posteriorment es van rentar les membranes amb TBST i es van incubar amb l'anticòs secundari durant 30 minuts a temperatura ambient. L'anticòs primari i secundari es

van diluir amb TBST a la concentració corresponent (**Taula 3 i 4**). Les membranes es van incubar durant 5 minuts amb Immobilon™ Western (P90720, Millipore) i es van revelar en el ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad).

La quantificació dels western-blot es va fer utilitzant el software del mateix aparell, Image Lab 4.0.1. En general, en les immunoprecipitacions es van quantificar els píxels de l'immunoprecipitat i es relativitzaven amb els píxels de la proteïna en els llistats totals.

9. Anticossos

En les següents taules estan especificats els anticossos primaris utilitzats (**Taula 3**) i els secundaris utilitzats per western-blot (**Taula 4**) i immunofluorescència (**Taula 5**). També l'hoste d'on s'han obtingut, la concentració d'ús, la referència i la casa comercial.

Anticossos Primaris	Clonalitat	Hoste	Concentració d'ús WB/IF	Referència	Casa comercial
Anti-Myc	9E10	Ratolí	1:1000 1:250	-	Propi
Anti-DDDDK tag	P	Conill	0,1µg/mL 1µg/mL	ab21536	Abcam
Anti-FLAG M2	M2	Ratolí	- 2µg/mL	F3165	SIGMA
Anti-HA	3F10	Rata	0,1µg/mL -	118674230 01	Roche
Anti-FLRT3	P	Cabra	0,5µg/mL 1,6µg/mL	AF2795	R&D Systems

Anti-Robo1	P	Conill	1µg/mL -	Ab7279	Abcam
Anti-Robo1	P	Conill	1µg/mL -	NB600-1254	Novus Biologicals
Anti-Robo1	M	Ratolí	0,33µg/mL 0,84µg/mL	vRobo1	DSHB
Anti-DCC	G92-13	Ratolí	5µg/mL -	554222	BD Pharmingen
Anti-DCC	G97-449	Ratolí	5µg/mL -	554223	BD Pharmingen
Anti-DCC	P	Cabra	- 1µg/mL	AF844	R&D Systems
Anti-Rac1	M	Ratolí	- 1,25µg/mL	610650	BD Transduction Labs
Anti-pCREB	P	Conill	1µg/mL -	6519	Millipore
Anti-pMLC2 (Ser19)	P	Conill	1/500 -	3671	Cell Signaling
Anti-pCofilina (Ser3)	P	Conill	1µg/mL -	NB100- 81865	Novus Biologicals
Anti-Cofilina	P	Conill	1/1000 -	NB100-1900	Novus Biologicals

Anti-Cdc42	M	Ratolí	- 1,25µg/mL	610928	BD Transduction Labs
-------------------	---	--------	----------------	--------	----------------------------

Taula 3 Anticossos primaris utilitzats en western-blot i immunofluorescència. P: policlonal i M: monoclonal.

Anticossos Secundaris (WB)	Hoste	Concentració d'ús	Referència	Casa comercial
Peroxidase-conjugated	IgG Ratolí	0,8µg/mL	715-035-150	Jackson ImmunoResearch
Peroxidase-conjugated	IgG Cabra	0,8µg/mL	705-035-147	Jackson ImmunoResearch
Peroxidase-conjugated	IgG Rata	0,8µg/mL	712-035-150	Jackson ImmunoResearch
Peroxidase-conjugated	IgM Ratolí	0,8µg/mL	715-035-020	Jackson ImmunoResearch
HRP-linked	IgG Conill	1/1000	NA9340V	GE Healthcare

Taula 4 Anticossos secundaris utilitzats per western-blot.

Anticossos Secundaris (IF)	Hoste	Concentració d'ús	Referència	Casa comercial
Alexa Fluor®488-conjugated	IgG Rata	1.25µg/mL	712-545-150	Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor®488-conjugated	IgG Conill	1.25µg/mL	711-545-152	Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor®488-conjugated	IgG Ratolí	1.25µg/mL	715-545-150	Jackson ImmunoResearch

Alexa Fluor®488-conjugated	IgG Cabra	1µg/mL	705-545-147	Jackson ImmunoResearch
Cy™3-conjugated	IgG Ratolí	1.25µg/mL	715-165-151	Jackson ImmunoResearch
Cy™3-conjugated	IgG Cabra	1µg/mL	705-165-147	Jackson ImmunoResearch
Cy™3-conjugated	IgG Rata	1.25µg/mL	712-165-150	Jackson ImmunoResearch
Cy™3-conjugated	IgG Conill	1.25µg/mL	711-165-152	Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor®647-conjugated	IgG Rata	1.25µg/mL	712-605-150	Jackson ImmunoResearch
Cy™5-conjugated	IgG Ratolí	1.25µg/mL	715-175-150	Jackson ImmunoResearch
Cy™5-conjugated	IgG Cabra	1.25µg/mL	705-175-147	Jackson ImmunoResearch
Cy™5-conjugated	IgG Conill	1.25µg/mL	711-176-152	Jackson ImmunoResearch
FITC	IgG+IgM Ratolí	1.33µg/mL	715-095-140	Jackson ImmunoResearch
Texas Red®-X phalloidin	-	6U	T7471	Molecluar Probes (Invitrogen)

Taula 5 Anticossos secundaris utilitzats per immunofluorescència. Tots els secundaris utilitzats són de crosreacció mínima.

10. Clonatges

Nom final	Vector destí	Insert	Oligonucleòtids	Enzims
MDN-V-29	pSecTagB	Robo1 Δ C	Fw: 5'Phos- gaacaaaaactcatctcagaagagg Rv: 5'Phos-tgttggtgtgaaggtaaaggacg	-
MDN-V-30	pcDNA3Myc HisC+	Robo1: ECD+TM	Fw: gaattcgaaccactgcttactggcttatcg Rv: gatatcaatatttcttcttgcgggtcggtaaagc	EcoRI SspI- EcoRV
MDN-V-31	pcDNA3Myc HisC+	Robo1: ECD+TM	Fw: gaattcgaaccactgcttactggcttatcg Rv: gatatcatttaaatgacgggactttccgccccgcg	EcoRI Swal- EcoRV
MDN-V-32	pBluescript II ks	Robo1- ICD-Myc	Fw: atntaaatcccgggctcagcagcacgtacgcgggg Rv: gcggccgcggtggcaactagaaggcacagtcg	Swal- SmaI NotI
MDN-V-33	pBluescript II ks	Robo1- ICD-Myc	Fw: cccggggttaacttcacaccaacagtaacttatcaa agagg Rv: gcggccgcggtggcaactagaaggcacagtcg	SmaI- HpaI NotI
MDN-V-110	pcDNA3	Robo1- N-Myc	Fw: gaattctgaacaaaaactcatctcagaagaggat ctggggaagcttattccagaccctgaggaccagctt attcc Rv: ggggcggccgctcagctttcagtttctctaattcttc	EcoRI NotI

MDN-V-116	pcDNA3Myc HisC+	Robo2	Fw: gggaagcttgggattggttcttaacaacc Rv: gggctcgaggattctgaataattccattctgg	HindIII XhoI
MDN-V-121	MDN-V-30	Robo1- ICD Δ CC1	Fw: gaattccagctcatccaggcaaatct Rv: gaattctgccctgatggattgacaa	SspI- SmaI NotI
MDN-V-122	MDN-V-30	Robo1- ICD Δ CC2	Fw: gaattccacagcaacagcgaggaata Rv: gaattccaagtctgccagttcatgc	SspI- SmaI NotI
MDN-V-123	MDN-V-30	Robo1- ICD Δ CC3	Fw: gaattcataaaatcgcccagtgccagttcc Rv: gaattcatcatctgtgtaggcctctctgcg	SspI- SmaI NotI
MDN-V-124	MDN-V-30	Robo1- ICD-Myc	-	SspI- SmaI NotI

Taula 6 Construccions creades en clonatges. Δ C: deleció de tot el domini intracel·lular, ECD: domini extracel·lular, TM: domini transmembrana i ICD: domini intracel·lular.

11. DNAs utilitzats

Nom	Vector	Insert	Etiqueta	Casa comercial
JEN055	pcDNA3	FLRT3	C-FLAG	-
JEN146	JEN145	FLRT3	N-Myc	-
pEGFP	pEGFP-N1	EGFP	-	Clontech
MDN-V-0005	pSecTagB	Robo1	C-Myc	-

MDN-V-110	pcDNA3	Robo1	N-Myc	-
MDN-V-29	pSecTagB	Robo1ΔC	C-Myc	-
MDN-V-121	pcDNA3MycHisC+	Robo1ΔCC1	C-Myc	-
MDN-V-122	pcDNA3MycHisC+	Robo1ΔCC2	C-Myc	-
MDN-V-123	pcDNA3MycHisC+	Robo1ΔCC3	C-Myc	-
JEN192	pNEGFP	FLRT3ΔC-GFP	C-GFP	-
MDN-V-21	pcDNA3	DCC	C-HA	-
MDN-V-116	pcDNA3MycHisC+	Robo2	C-Myc	-
JEN140	pcDNA3	Unc5B	C-FLAG	-

Taula 7 DNAs utilitzats en els experiments de transfecció.

12. PCR *FLRT3*^{-/-}

Per fer la PCR per genotipar quins embrions eren *FLRT3*^{-/-} es van tallar les seves cues i es va extreure el DNA amb 50mM NaOH, el qual es va afegir en els tubs on estaven les cues i es va bullir durant 15 minuts a 94°C tres cops, entre bullida i bullida es va vortejar. Per neutralitzar, es va afegir 1:10 de 1,5M Tris pH8.1. D'aquesta solució que contenia el DNA es van utilitzar 1,5μL per condició de PCR. Hi ha tres productes que es volen amplificar: FLRT3lx, FLRT3mutant i Cre. Per cada condició de PCR la barreja és de 25μL volum final i conté 2,5μL del tampó de la Taq 10X, 1,5μL de dNTPs (stoc 100mM), 0,25μL de cada oligonucleòtid (estoc 100mM), 0,75μL de Taq, 1,5μL del DNA extret en les cues i aigua fins 25μL. Tant la Taq polimerasa com el seu tampó (10mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl, 0,001% gelatina i 2,5mM de MgCl₂) estan fets en el nostre laboratori. El programa per amplificar els productes de PCR és el següent: 94°C durant 3 minuts, 38 x (94°C durant 1 minut + 62°C durant 1 minut + 72°C durant 1 minut), 72°C durant 20 minuts i 4°C. Els productes de PCR es van resoldre mitjançant electroforesi en gels de 2% acrilamida amb el tampó TAE (40mM Tris base, 20mM àcid acètic i 1mM EDTA), el DNA es va tenyir amb una solució d'EtBr (0,5μg/mL) i es va

revelar amb el transil·luminador.

Els oligonucleòtids per amplicar el producte FLRT1x són 5' gatatttgccaaaggagacagaaaatactggc (JEF 30) i 5' ctgggttcattgctgtctaccaacaagcac (JER 38).

Els oligonucleòtids per amplicar el producte Cre són 5' gtggcagatggcgcggcaacaccatt (Cre 1) i 5' gcctgcattaccggtcgtgcaacga (Cre 2).

Els oligonucleòtids per amplicar el producte FLRT3mutant són 5' gcttatactacaagggctcatgtgaacgc (JEF 11), 5' ggctgcaggaattcgatatcaagcttatcg (JEF 12) i 5' ccggtactaagaaagacaactccatcctgg (JER 19).

13. Drogues utilitzades i proteïna recombinant

Nom	Concentració d'ús	Referència	Casa comercial
TAPI-1	50µM	579053	Calbiochem®
PMA	0,2 i 0,8µM	P8139	SIGMA
Ciclohexamida	100µM	239763	Calbiochem®
Forskolina (FSK)	10µM	344281-5MG	MERCK
UO126	50µM	9903	Cell Signaling
LY294002	10µM	9901	Calbiochem®
Y27632	10µM	688000	Calbiochem®
SQ22536	1mM	568500	Calbiochem®
Slit-1	0,25µg/mL	5199-SL-050	R&D Systems
Netrin-1	0,5µg/mL o 1µg	1109-N1-025	R&D Systems

FLRT3-Fc	1µg	-	-
Unc5B-Fc	1µg	1006-UN	R&D Systems

Taula 8 Drogues i proteïna recombinant utilitzades. En el cas de FLRT3-Fc i Unc5B-Fc es va dissoldre 1µg de la proteïna recombinant en 500µL de PBS. En el cas de Netrin-1 es va utilitzar 0,5µg/mL en les estimulacions que es van fer en les cèl·lules i 1µg dissolt en 500µL de PBS en els experiments de co-immunoprecipitació *in vitro*.

14. Estadística

Els resultats es presenten com la mitjana de tres experiments, excepte quan es menciona el contrari, \pm SEM. La comparació de les mitjanes entre diferents condicions es va fer amb la prova t-Student sent $*=p<0,05$ i $***=p<0,001$.

RESULTATS

1. Gens candidats que interaccionen amb el domini intracel·lular de FLRT3

Donat l'interessant patró d'expressió de FLRT3 en el sistema nerviós durant el desenvolupament (Mouse Atlas Project), el seu paper descrit en la internalització de Cadherina en *X. laevis* mitjançant la RhoGTPasa Rnd1 [143][144][142] i el seu paper descrit com a co-receptor de FGFR i modulador de la resposta de FGF [148] ens van permetre pensar que FLRT3 és capaç de desenvolupar una tasca de senyalització autònoma. A més a més, s'havia implicat en la migració radial en ratolí [147], tot i ser aquesta una funció cel·lular no autònoma, era una prova de que els FLRTs tenen un paper important en el desenvolupament del sistema nerviós de mamífers i per això vam pensar que potser la tasca de senyalització cel·lular autònoma la podria desenvolupar durant el desenvolupament del sistema nerviós de mamífers. Per intentar adreçar aquesta hipòtesi vam pensar que seria molt interessant buscar proteïnes que interaccionessin amb el domini intracel·lular (ICD) dels FLRTs. Per això vam escollir l'ICD de FLRT3, el membre més conservat de la família, ja que estàvem interessats en trobar noves funcions cel·lulars autònomes de FLRT3. Per aconseguir això, vam utilitzar la tècnica del doble híbrid on l'ICD de FLRT3 era el fragment proteic d'estudi que es va confrontar a una llibreria de cDNAs de cervell humà en estadi embrionari d'entre 20 i 33 setmanes de gestació (veure Material i Mètodes). Segons la classificació de Theiler i de Carnegie aquest període correspon a una etapa adulta de ratolí [325]. Mitjançant aquesta tècnica vàrem poder aïllar tota una llista de proteïnes candidates que possiblement podrien interaccionar amb el domini intracel·lular de FLRT3.

Després del "mating", en el què es van formar les cèl·lules diploides, es van seleccionar les colònies positives sembrant en plaques amb medi SD sense els aminoàcids que només els diploides i amb una interacció positiva eren capaces de sintetitzar: Adenina (-Ade), Histidina (-His), Triptofan (-Trp) i Leucina (-Leu). A més a més, com que aquestes cèl·lules també contenien el gen reporter MEL1, que codifica per una α -galactosidasa, havien de ser blaves en plaques que a més continguessin el substrat cromogènic X α Gal. Paral·lelament es va determinar l'eficiència de diploides amb

l'equació descrita en l'apartat de Material i Mètodes, Doble híbrid.

En plaques amb medi SD -Ade, -His, -Trp, -Leu van créixer un total de 327 colònies. No obstant, només 114 d'aquestes 327 van ser blaves en les plaques amb medi SD -Ade, -His, -Trp, -Leu, +XαGal. Aquesta diferència podria ser deguda a que la majoria d'interaccions eren febles i no eren capaces d'activar l'expressió de MEL1, és a dir, només les interaccions més fortes són capaces d'activar MEL1 i donar el color blau en presència de XαGal i per tant, són aquestes les vàlides. També podria ser degut a que fossin falsos positius, ja que alguns cDNAs-GAL4AD poden activar alguns dels gens reporters, però no tots, degut a una inaccessibilitat del cDNA-GAL4AD en qüestió a la UAS (upstream activating sequences) específica. MEL1 té una UAS diferent a HIS3 i a ADE2.

En el càlcul de l'eficiència de diploides es van obtenir els següents resultats:

Medi	Dilució 1:100	Dilució 1:1000	Dilució 1:10000
SD -Leu	Incomptable	Incomptable	137
SD -Trp	Incomptable	Incomptable	240
SD -Leu, -Trp	Incomptable	170	86

Taula 9 Eficiència en la formació de diploides. El càlcul de l'eficiència de diploides es va dur a terme seguin l'equació que apareix en l'apartat de Material i Mètodes, Doble híbrid. En la dilució 1:10000 és l'única en la què vam poder comptar el nombre de colònies i es veu que la soca que conté el gen Leu és la limitant en la formació de diploides.

El creixement en la placa amb medi SD-Leu és menor que el creixement en la placa amb medi SD-Trp, per tant, la soca que conté la llibreria de cDNAs és la parella limitant. Aplicant la fórmula, anteriorment indicada es va calcular l'eficiència de diploides que va donar un resultat de 62,77%.

Els 114 clons obtinguts es van seqüenciar i les seves seqüències es van analitzar en la base de dades BLAST per determinar si la seqüència pertanyia a la seqüència codificant (CDS) del gen i si estava en pauta amb l'ORF (Open Reading Frame) de Gal4-BD. D'aquests anàlisis només vam poder obtenir les seqüències de 44 gens, però només 23

d'ells complien els dos requisits, que estiguessin expressats en pauta amb Gal4-BD i que la seqüència identificada pertanyés a la seqüència codificant del gen. En la següent taula es fa una breu descripció de cadascun d'ells (**Taula 10**).

NOM	DESCRIPCIÓ
ERBB3	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3. Membre de la família EGFR. Proteïna unida a la membrana amb domini d'unió a neuregulina i sense domini quinasa actiu. La seva heterodimerització porta a l'activació de vies implicades en proliferació cel·lular o diferenciació. L'amplificació d'aquest gen i/o la sobreexpressió de la proteïna s'ha trobat en diversos càncers.
RTN1	Reticulon 1. Associada amb reticle endoplasmàtic i involucrada en secreció neuroendocrina o en el transport cap a la membrana de cèl·lules neuroendocrines.
MUC20	Mucin 20, cell surface associated. Membre de la família de proteïnes mucines. La isoforma més curta es localitza a la membrana plasmàtica i la més llarga pot ser secretada. La regió C-terminal s'associa amb el lloc d'acoblament del proto-oncogen met i suprimeix les seves cascades de senyalització intracel·lular.
GFAP	Glial fibrillary acidic protein. És una de les principals proteïnes de filaments intermedis en astròcits madurs. La seva mutació causa la malaltia anomenada Alexander
ROBO1	Roundabout, axon guidance receptor, homolog 1. Membre de la superfamília de les immunoglobulines que codifica per una proteïna transmembrana implicada en guia axonal i migració de precursors neurals. Receptor activat per la família de proteïnes Slit resultant en un efecte repulsiu.

SNRPG	Small nuclear ribonucleoprotein G. Possiblement té algun paper en el complex U7 snRNP que està implicat en el processament de l'extrem 3' de les histones. Associada amb snRNP U1, U2, U4/U6 i U5.
OTUB1	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1. És una ubiquitina isopeptidasa de gran especificitat que talla les ubiquitines de les cadenes poliubiquitinades.
USP35	Ubiquitin specific peptidase 35. És un enzim tioesterasa que catalitza la hidròlisi de la ubiquitina dels conjugats d'ubiquitina.
NR2F2	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2. Membre de la superfamília de receptors nuclears de l'hormona esteroide-tiroidea. Aquesta proteïna és un factor de transcripció induïble per lligand implicat en la regulació de diversos gens.
HSP40	Membre de la família de proteïnes DNAJ heat shock protein40 que es caracteritza per tenir dos dominis N-terminal tetratricopeptide repeat i un domini C-terminal DNAJ. Té la capacitat d'unir-se a les proteïnes chaperones heat shock proteins 70 i 90 de forma ATP-depenent i pot actuar com a co-chaperona.
E1α1 (EEF1A1)	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1. És una isoforma de la subunitat alfa del complex del factor d'elongació 1, què és responsable de l'alliberació enzimàtica de l'aminoacil tRNA al ribosoma. Aquesta isoforma s'ha identificat com un autoantigen en el 66% dels pacients amb el síndrome Felty.
GGA1	Golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1. Els membres d'aquesta família de proteïnes regulen el transport de proteïnes entre el golgi trans i el lisosoma. Interacciona amb SOR i forma part del complex adaptador de clatrina.
ZNF251	Zinc finger protein. Podria estar implicat en la regulació transcripcional.

NEU1	Sialidase 1. Enzim lisosomal que elimina els residus d'àcid siàlic terminals. Forma part d'un complex heterodimèric juntament amb la beta-galactosidasa i la catepsina A. Realació entre Neu1 i plaques β -amiloides en un model de ratolí per la malaltia d'Alzheimer.
ALDOC	Aldolase C, fructose-biphosphate. Enzim glicolític que s'expressa específicament en l'hipocamp i les cèl·lules de Purkinje del cervell.
GFM2	G elongation factor, mitochondrial 2. És un dels factors d'elongació transcripcional de la mitocondria.
PSAP	Prosaposin. Precursor de quatre productes: saposines A, B, C i D. Localitzats principalment en els lisosomes on faciliten el catabolisme de glicoesfingolípids amb grups petits d'oligosacàrids. Són proteïnes no-enzimàtiques anomenades proteïnes activadores d'esfingolípids. S'ha descrit que indueixen supervivència en neurones.
CAMK2N1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1. Inhibidor específic de la CaM-quinasa II.
POU3F2	POU class 3 homeobox 2. Família de factors de transcripció que s'uneixen a la seqüència ATGCAAAT. Expressats en el sistema nerviós central tenen una implicació important en la neurogènesis de mamífers regulant el patró d'expressió de diversos gens.
CSR2	Cysteine and glycine-rich protein 2. Membre de la família CSRP que codifiquen per un grup de proteïnes amb domini LIM (amb activitat d'unió a zinc) que poden estar implicades en la regulació de processos importants pel desenvolupament i la diferenciació cel·lular. Substrat de GMPc en neurones entèriques i en múscul llis de l'intestí.
HSPC159	Galectin-related protein. S'anomena GRP i conté un domini de reconeixement de carbohidrats conservat i 38 residus addicionals en la part N-terminal. No té activitat d'unió a lactosa.

SIGIRR	Single Ig toll-interleukin receptor domain. Actua com a regulador negatiu de les vies de senyalització del receptor Toll-like i del receptor IL-1R.
FHIT	Fragile histidine triad gene. Proteïna implicada en el metabolisme de purines. Possible supressor tumoral per determinats teixits.

Taula 10 Gens identificats mitjançant la tècnica Doble híbrid. Llistat de gens, les proteïnes per les quals codifiquen probablement interaccionen amb el domini intracel·lular de FLRT3. Només apareixen els gens que estaven en pauta amb l'ORF de GAL4-BD i dels què es va trobar que la seqüència estava dintre de la seqüència codificant del gen. ORF: open reading frame.

Després de buscar informació sobre totes elles i de saber les seves funcions principals es van agrupar funcionalment en sis grups (**Figura 31**):

1. Síntesis de proteïnes. Dintre d'aquest grup s'han englobat proteïnes relacionades amb els processos de traducció i transcripció.
2. Senyalització. Dintre d'aquest grup hi ha receptors, proteïnes reguladores i molècules de senyalització.
3. Metabolisme. Dintre d'aquest grup hi ha proteïnes relacionades amb el metabolisme.
4. Transport citoplasmàtic. Dintre d'aquest grup hi ha proteïnes relacionades amb processos d'endocitosi, processos d'exocitosi i transport de vesícules en el citoplasma.
5. Desubiquitinació. Dintre d'aquest grup s'han agrupat proteïnes encarregades d'hidrolitzar les cadenes d'ubiquitina.
6. Citoesquelet. Dintre d'aquest grup hi ha proteïnes del citoesquelet de cèl·lules eucariotes.

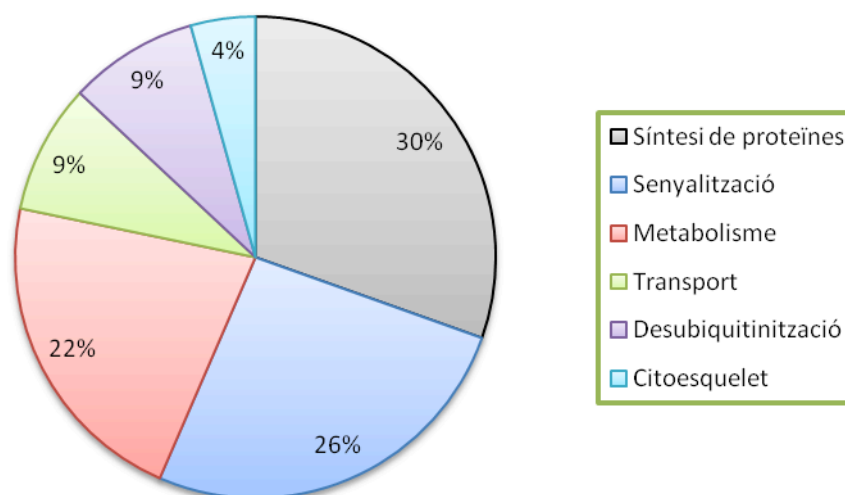


Figura 31 Agrupació funcional de les proteïnes que interaccionen amb l'ICD de FLRT3. Els gens s'agrupen en sis categories funcionals: els implicats en la síntesi de proteïnes, en processos de senyalització, en processos metabòlics, en transport, en processos de desubiquitinització i els pertanyents a formar part del citoesquelet tal i com s'indica.

Principalment, la major proporció de les proteïnes que es van trobar són aquelles relacionades amb la síntesi de proteïnes (regulació transcripcional, processament del mRNA o elongació de la cadena polipeptídica) amb un 30% del total. Seguidament, i amb un 26% del total, es troben les proteïnes implicades en processos de senyalització. Posteriorment, es troben les proteïnes implicades en processos metabòlics amb un 22%. I per últim, es troben proteïnes implicades en transport citoplasmàtic, desubiquitinització i citoesquelet que representen un 9%, 9% i 4% del total, respectivament.

2. Interacció entre FLRT3 i Robo1

De tot el llistat de proteïnes obtingut mitjançant la tècnica del doble híbrid vam escollir Robo1 per continuar amb l'estudi donat que aquest receptor és un dels més caracteritzats i conservats en el desenvolupament del sistema nerviós. Com ja s'ha explicat en la introducció Robo1 és un receptor transmembrana per les molècules de guia Slit, junts desencadenen respostes de repulsió que són fonamentals per diversos processos de migració neuronal i de guia axonal durant el desenvolupament del

sistema nerviós, entre altres funcions [223][238][241][289][311][326]–[328].

Per comprovar la veracitat de la interacció entre Robo1 i FLRT3 vam fer dues coses, en primer lloc comprovar un altre cop el resultat obtingut en el “screening”, en llevat, mitjançant un doble híbrid dirigit amb els fragments de les proteïnes implicades i, en segon lloc, veure si aquesta interacció també es donava en cèl·lules eucariotes superiors amb les versions completes dels dos cDNAs.

En el primer cas, vam transformar el DNA extret del clon positiu que codificava per Robo1, de l'aminoàcid 449 fins el 1182 (Robo1¹⁴⁴⁹⁻¹¹⁸²), en la soca de llevat Y187 i el ICD de FLRT3 en la soca AH109, a l'invers de com s'havia donat la interacció en el doble híbrid (**Figura 32A**). Això ens permetria saber si Robo1 i el ICD de FLRT3 per sí sols eren capaços d'activar l'expressió dels gens reporters de l'altra soca, és a dir, si hi havia transactivació. En aquest experiment, primer, vam fer créixer per separat la soca que tenia el DNA BD-FLRT3-ICD, el BD-buit, l'AD-Robo1¹⁴⁴⁹⁻¹¹⁸² i l'AD-buit. Un cop crescudes les dues soques vam tornar a fer el “mating” utilitzant les mateixes condicions que hi havia hagut en el “mating” inicial. Els creuaments van ser els següents: la soca que tenia el DNA BD-FLRT3-ICD amb la que tenia l'AD-buit, la que tenia el BD-buit amb la que tenia l'AD-Robo1¹⁴⁴⁹⁻¹¹⁸² i la que tenia el BD-FLRT3-ICD amb la que tenia l'AD-Robo1. Després d'aquest temps vam plaquejar els diploides formats en plaques SD - Trp, -Leu, SD -Ade, -His, -Trp, -Leu i plaques SD -Ade, -His, -Trp, -Leu, +XαGal (**Figura 32B**).

En les plaques SD -Trp, -Leu, com era d'esperar, van créixer els diploides de totes les combinacions d'aparellament ja que en el cas de formar-se els diploides, aquests tindrien els dos plàsmids per la síntesi de Trp i Leu, respectivament. En les plaques SD -Ade, -His, -Trp, -Leu, però, només van créixer els diploides de la combinació BD-FLRT3-ICD amb AD-Robo1¹⁴⁴⁹⁻¹¹⁸² indicant que la interacció és específica i requereix dels dos fragments de proteïna (**Figura 32B**). Aquest resultat era el que estàvem esperant, ja que si hi hagués hagut creixement d'alguna de les altres dues combinacions voldria dir que o bé FLRT3-ICD o bé Robo1¹⁴⁴⁹⁻¹¹⁸² era capaç d'activar la transcripció del gen reporter per sí sol, sense necessitat d'interaccionar amb l'altre (**Figura 32B**).

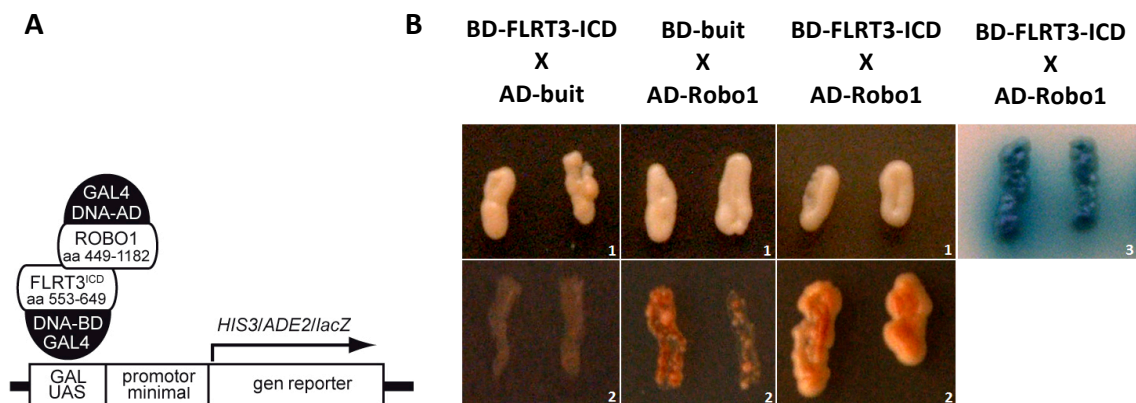


Figura 32 Assaig de transactivació mitjançant el mètode del doble híbrid. A) Esquema representatiu de la interacció entre l'AD-Robo1¹⁴⁴⁹⁻¹¹⁸² i el BD-FLRT3-ICD que té lloc en llevats diploides i que activa l'expressió dels gens reporters indicats (HIS3/ADE2/MEL1). B) Imatges representatives de colònies ressemerades en plaques SD -Trp, -Leu (1), SD -Ade, -His, -Trp, -Leu (2) i SD -Ade, -His, -Trp, -Leu, +XαGal (3).

Vam observar un petit creixement en la combinació BD-buit amb AD-Robo1¹⁴⁴⁹⁻¹¹⁸² suggerint que aquest fragment té certa activitat transactivadora per ell mateix (**Figura 32B**). No obstant, aquest creixement era molt menor que el que vàrem observar en la combinació BD-FLRT3-ICD amb AD-Robo1¹⁴⁴⁹⁻¹¹⁸² (**Figura 32B**), i per això vam concloure que havia interacció específica entre les dues proteïnes.

El pas següent va ser estudiar si la interacció es produïa també en cèl·lules eucariotes superiors i per això, es va fer un assaig de co-immunoprecipitació en la línia cel·lular HEK293T prèviament transfectades amb els següents plàsmids d'expressió:

Exp.: pSecTagB-Robo1^{C-Myc} + pCDNA3 (control vector buit)

pSecTagB-Robo1^{C-Myc} + pCDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

pSecTagB-Robo1^{C-Myc} + pNEGFP-FLRT3^{ΔC-GFP}

Els plàsmids utilitzats codifiquen per la forma sencera de les dues proteïnes per tal de determinar si la interacció també té lloc en aquestes circumstàncies. Vam incloure FLRT3^{ΔC-GFP} com a control negatiu, un mutant de FLRT3 al qual se li ha substituït el ICD per GFP, per tenir una evidència més de que la interacció requereix el ICD de FLRT3 i confirmar així una vegada més el resultat obtingut en el doble híbrid.

Després de la immunoprecipitació, els llisats totals i els immunoprecipitats els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i els vam analitzar per western-blot amb anticossos específics contra Myc (Robo1) i contra FLRT3 (**Figura 33A**).

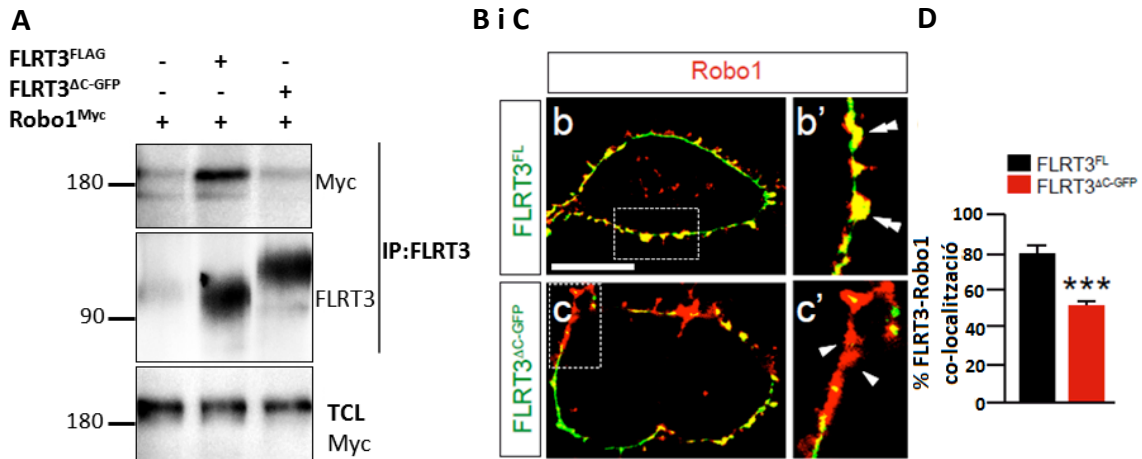


Figura 33 Interacció entre les formes senceres de FLRT3 i Robo1 en cèl·lules HEK293T transfectades. A) Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb Robo1^{Myc} i FLRT3^{FLAG} o FLRT3^{ΔC-GFP} tal i com s'indica. Llissats d'aquestes cèl·lules es van immunoprecipitar amb un anticòs contra ECD-FLRT3 i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos contra Myc (Robo1, panel superior) i FLRT3 (panel central). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Myc (Robo1) per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem que Robo1 co-immunoprecipita amb FLRT3 quan aquest és la proteïna sencera (carril 2, panel superior), en canvi quan a FLRT3 li falta el domini intracel·lular, FLRT3^{ΔC-GFP}, aquesta interacció es perd (carril 3, panel superior). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). B i C) Imatges representatives d'immunofluorescències per detectar la localització cel·lular de FLRT3 i Robo1. Després de transfectar-se amb la combinació de plàsmids indicada, les cèl·lules es van fixar i es van sotmetre a immunofluorescència amb anticossos contra Myc (Robo1 en vermell) i FLRT3 (en verd) i els anticossos secundaris corresponents (veure Material i Mètodes). b' i c' són imatges ampliades de les regions marcades en b i c, respectivament. Els caps de fletxa en c' indiquen regions de membrana on es troba Robo1 sol. D) Quantificació de co-localització de FLRT3 (barra negra) o FLRT3^{ΔC-GFP} (barra vermella) amb Robo1 on es va mesurar el percentatge de pixels verds (FLRT3) que co-localitzen amb pixels vermells (Robo1) en el software ImageJ. Les dades es presenten com la mitjana + SEM de tres experiments, en cada condició de cada experiment es van recomptar unes 20-30 cèl·lules. Estadística test t-Student. ***P<0,001. Escala 10µm. IP: immunoprecipitat, TCL: llisat total i FLRT3^{FL}: proteïna sencera.

En aquest experiment confirmem que la interacció entre FLRT3 i Robo1 té lloc en cèl·lules eucariotes superiors i que són capaces d'interaccionar en la seva forma

sencera i madura, ja que quan immunoprecipitem FLRT3 som capaços de baixar conjuntament a Robo1 (**Figura 33A**). Per tenir un control de que l'anticòs utilitzat en la immunoprecipitació no s'unia directament a Robo1 de manera inespecífica i que el resultat observat fos dependent únicament de la presència de FLRT3, hi havia una condició on Robo1 es va transfectar sol (carril 1) (**Figura 33A**). En aquesta condició podem apreciar una banda molt tènue a l'alçada del pes molecular de Robo1, >180kDa, però que en cap cas és comparable amb la que apareix en la condició on Robo1 es co-immunoprecipita amb FLRT3 (carril 2), condició on Robo1 co-immunoprecipita amb FLRT3 (**Figura 33A**). De forma similar, aquesta banda tènue també apareix en la condició on Robo1 es co-expressa amb FLRT3^{ΔC-GFP} (carril 3), la construcció control on FLRT3 no té l'ICD (**Figura 33A**). Com que la banda que apareix té intensitat similar a la de la condició control, creiem que Robo1 no ha co-immunoprecipitat amb FLRT3^{ΔC-GFP}, de manera de podem concloure que les formes senceres de Robo1 i FLRT3 interaccionen *in vitro* i que perquè es doni la interacció és necessari l'ICD de FLRT3.

Un cop confirmada la interacció entre ambdues proteïnes, volíem veure si aquesta interacció passava al llisat o si co-localitzaven en el interior de la cèl·lula. Per adreçar aquesta qüestió, vam transfectar cèl·lules HEK293T amb les mateixes construccions de DNA que en l'experiment anterior i vam fer una immunofluorescència en cèl·lules fixades utilitzant anticossos específics contra Myc (Robo1) i contra FLRT3 (**Figura 33B i C**). En primer lloc i com era d'esperar, el que vam veure és que les dues proteïnes es localitzaven principalment en la membrana citoplasmàtica (**Figura 33B i C**). En aquesta localització FLRT3 i Robo1 tenien una co-localització del 80% en la condició on les dues proteïnes en la forma sencera s'havien transfectat (**Figura 33B i C**). En la condició on havíem transfectat a Robo1 amb la construcció FLRT3^{ΔC-GFP} aquesta colocalització va disminuir significativament en un 30%, donant suport al fet de que és necessari el domini intracel·lular de FLRT3 perquè es doni la interacció. Tot i aquesta gran disminució, nosaltres esperàvem que la co-localització es perdés per complet, ja que en l'assaig de co-immunoprecipitació així succeïa. L'explicació que li vam donar és que possiblement aquesta disminució del 30% en la co-localització és suficient per perdre la detecció de Robo1 en el western-blot de la co-immunoprecipitació amb FLRT3.

Alternativament, com les dues proteïnes es localitzen en la membrana, la resolució del confocal no és suficient per resoldre diferències subtils de localització.

3. El domini intracel·lular de Robo1 és necessari per la interacció

Els resultats anteriors indicaven que la interacció Robo1-FLRT3 té lloc dintre de la mateixa cèl·lula, en *cis*, i que l'ICD de FLRT3 era necessari. El domini intracel·lular de Robo1 és substancialment bastant més gran que el de FLRT3 (gairebé 750 aminoàcids respecte els 100 de FLRT3) i a més diferents regions (dominis CC) s'han implicat en l'activació de diferents vies de senyalització intracel·lular (veure Introducció). Per intentar acotar el domini d'interacció i la possible funció d'aquesta, vam construir diversos mutants del receptor Robo1. En primer lloc, un mutant al que se li havia deletat tot el domini intracel·lular i se li havia posat l'etiqueta Myc, Robo1 Δ C^{Myc}. En segon lloc, tres mutants als que se'ls havia deletat cadascun dels dominis CC conservats de la regió intracel·lular i se'ls havia posat l'etiqueta Myc, Robo1 Δ CC1^{Myc}, Robo1 Δ CC2^{Myc} i Robo1 Δ CC3^{Myc}. No es va fer cap mutant del domini conservat CC0 perquè no hi havia descrita cap funció per ell. Contràriament, els altres tres dominis s'havien descrit que interaccionaven amb altres proteïnes, algunes d'elles de senyalització [71][159][219], i vam pensar que si es perdia la interacció amb algun d'ells ens podria donar alguna pista més sobre la possible funció que tenia la interacció FLRT3-Robo1. Un cop es van obtenir aquests mutants de Robo1 i abans de continuar amb els experiments d'interacció, aquestes noves construccions es van transfectar en cèl·lules HEK293T per comprovar mitjançant immunofluorescència que la mutació no afectava la sublocalització cel·lular i que tinguessin la mateixa localització dintre de la cèl·lula que el receptor sencer. Aquest anàlisi previ va mostrar que tots els mutants de Robo1 es van observar en la membrana citoplasmàtica d'igual manera al receptor Robo1 sencer (resultat no mostrat). L'experiment d'interacció es va dur a terme finalment per co-immunoprecipitació similar al fet en la **Figura 33A**. Així, en cèl·lules HEK293T vam transfectar els següents plàsmids d'expressió:

Exp.: pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

pSecTagB-Robo1 Δ C^{Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

pcDNA3MycHisC+-Robo1 Δ CC1^{Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

pcDNA3MycHisC+-Robo1 Δ CC2^{Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

pcDNA3MycHisC+-Robo1 Δ CC3^{Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

Després de la immunoprecipitació, els llisats totals i els immunoprecipitats els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE els vam analitzar per western-blot amb anticossos específics contra Myc (Robo1) i contra FLAG (FLRT3) (**Figura 34A**).

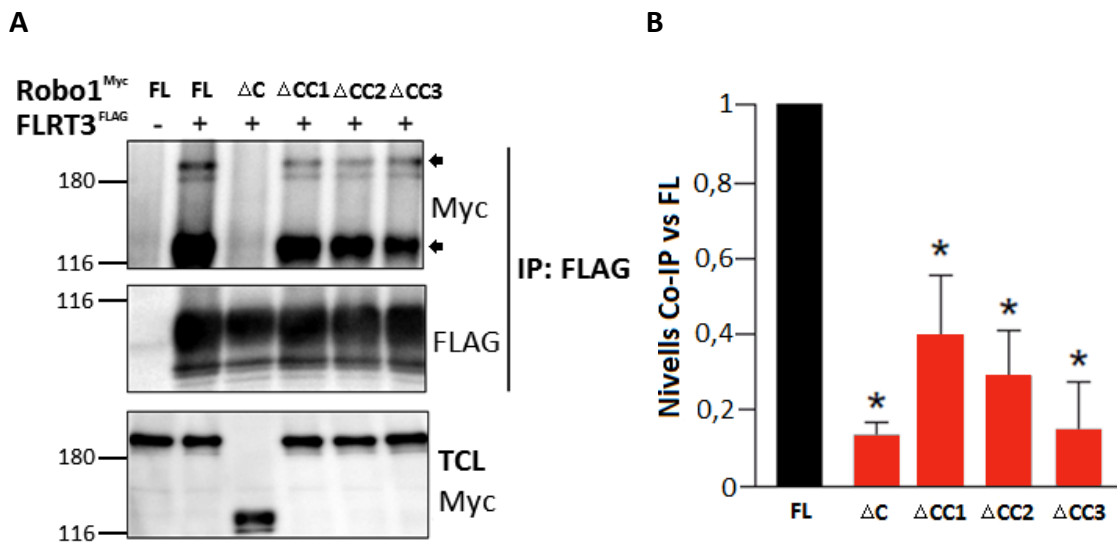


Figura 34 El domini intracel·lular de Robo1 és necessari per la interacció amb FLRT3. A) Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb FLRT3 i els diferents mutants de deleció de Robo1 tal i com s'indica (Robo1 Δ C, mutant sense l'ICD; Robo1 Δ CC1, 2 o 3, mutant sense la corresponent regió CC). Llissats d'aquestes cèl·lules es van immunoprecipitar amb resina anti-FLAG (FLRT3) i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos contra Myc (Robo1, panel superior) i FLAG (FLRT3, panel central). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Myc per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem la pèrdua d'interacció entre FLRT3 i Robo1 quan a aquest últim li falta el domini intracel·lular (carril 3, panel superior). En les condicions on hem transfectat FLRT3 amb Robo1 Δ CC1, Robo1 Δ CC2 o Robo1 Δ CC3 (carril 4, 5 o 6, respectivament, panel superior) veiem una petita pèrdua d'interacció tot i que en cap moment s'aboleix per complet (fletxa superior). En els immunoprecipitats de FLRT3 amb

qualsevol forma de Robo1 (carrils 2, 4-6), apareix una banda immunoreactiva per l'anticòs contra Myc, d'uns 130kDa (fletxa inferior, panel superior). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). B) Quantificació dels nivells de co-immunoprecipitació amb FLRT3 de cadascun dels mutants de Robo1 (barres vermelles) respecte la proteïna sencera (barra negra), condició que pren el valor 1. La quantificació es va realitzar en ImageJ tenint en compte els píxels de cadascuna de les bandes i els nivells a l'immunoprecipitat, es va corregir pels nivells de proteïna de partida al llisat total (panel inferior en A). Dades presentades com la mitjana + SEM de tres experiments. Estadística test t-Student. *P<0,05. FL: "full length" o proteïna sencera, TCL: llisat total, IP: immunoprecipitat i Co-IP: co-immunoprecipitat.

En aquest experiment vam veure diverses coses interessants. Primer, que quan co-immunoprecipitem FLRT3 no som capaços de baixar a Robo1 Δ C (carril 3, panel superior) (**Figura 34A**). En els immunoprecipitats no apareix cap banda a l'alçada esperada, ~120kDa, mentre que sí la veïem en els llisats totals; fet que ens indicava que no hi havia hagut cap problema d'expressió i vam concloure que perquè es doni la interacció entre FLRT3 i Robo1 són necessaris els ICDs de les dues proteïnes. I segon, que tot i deletar els dominis conservats CC1, CC2 o CC3 no es perd la interacció amb FLRT3, fletxa superior (carril 4, 5 o 6, respectivament, panel superior) (**Figura 34A**). En els tres casos veïem una disminució significativa de la interacció, sobretot al deletar el domini CC3, però sempre veïem la banda corresponent a la proteïna sencera, >180kDa (**Figura 34A i B**). D'aquest resultat vam extreure la conclusió de que possiblement els tres dominis participen en la interacció amb FLRT3, però que cap d'ells és essencial. Aquest experiment, per tant, no ens va proporcionar cap informació sobre la possible funció de la interacció FLRT3-Robo1 en termes de mecanismes de senyalització on pugués estar implicada. Nosaltres esperàvem que si es perdia la interacció al deletar un dels dominis CC, com que cada domini té descrites diverses proteïnes de senyalització que hi interaccionen [71], podríem veure si a l'estar FLRT3 aquestes proteïnes de senyalització per exemple no s'unien a Robo1 i llavors no podien fer la seva funció.

4. Especificitat de la interacció FLRT3-Robo1

Sabiem que FLRT3 i Robo1 interaccionaven en *cis*, dintre de la mateixa cèl·lula, pels

seus dominis intracel·lulars i volíem veure l'especificitat d'aquesta interacció comparant-la amb altres membres de la família de receptors Robo. Vam adquirir un vector amb el cDNA de Robo2 i el vam subclonar en el vector pcDNA3-Myc-His-C+ per obtenir un Robo2 fusionat amb l'etiqueta Myc en la seva part C-terminal. Vam escollir Robo2 per estudiar l'especificitat de la interacció FLRT3-Robo1 perquè pertany a la família de receptors Robo i conjuntament amb Robo1 està implicat en el control de la guia axonal dels principals tractes axonals del prosencèfal [241] o en la proliferació dels progenitors neurals [329], a més també intervé en la guia axonal dels axons comissurals [330], entre altres funcions. En termes d'homologia de seqüència, Robo1 i Robo2 comparteixen un 73% d'homologia front el 69% que hi ha entre Robo1 i Robo3. Vam comprovar que la localització cel·lular del receptor fos majoritàriament la membrana citoplasmàtica (resultat no mostrat) i vam transfectar cèl·lules HEK293T amb les següents combinacions de plàsmids d'expressió per fer assajos de co-immunoprecipitació:

Exp.: pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

pcDNA3MycHisC+-Robo2^{C-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3MycHisC+-Robo2^{C-Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

Vam realitzar la immunoprecipitació, vam resoldre els llisats totals i els immunoprecipitats mitjançant electroforesi SDS-PAGE i vam analitzar els resultats per western-blot amb anticossos específics contra Myc (Robo1/2) i contra FLAG (FLRT3) (**Figura 35**).

Com veiem en la figura, quan immunoprecipitem FLRT3 són capaços de co-immunoprecipitar a Robo1 (carril 2, panel superior) (**Figura 35**), però no a Robo2 (carril 4, panel superior) (**Figura 35**) tot i que té expressió, com es veu en els llisats totals (carrils 7 i 8, panel superior) (**Figura 35**). En el carril 4, panel superior, apareix una ombra a l'alçada de Robo2, però no hem considerat que sigui Robo2 ja que aquest porta l'etiqueta Myc i es va fer servir l'anticòs contra Myc que és molt específic i

sempre dóna una senyal molt intensa, en canvi el que veiem és una ombra i en cap cas una banda específica reactiva per l'anticòs contra Myc. És a dir, vam poder concloure que la interacció entre FLRT3 i Robo1 és específica, ja que FLRT3 no interacciona amb altres membres de la família de receptors Robo, com a mínim amb Robo2.

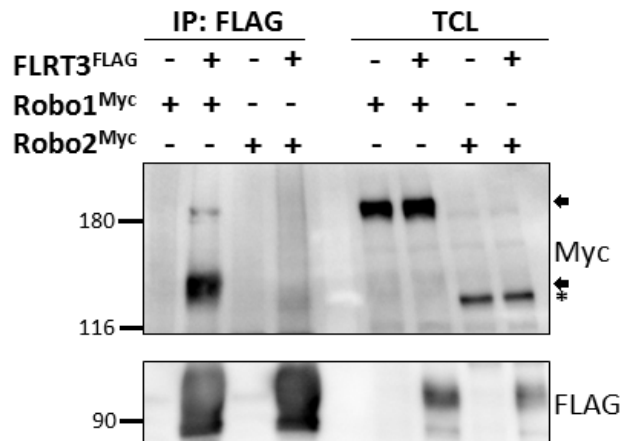


Figura 35 Robo1, però no Robo2, interacciona amb FLRT3. Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb FLRT3^{FLAG}, Robo1-Myc o Robo2-Myc tal i com s'indica. Llissats d'aquestes cèl·lules es van immunoprecipitar amb resina anti-FLAG (FLRT3) i els complexos es van analitzar per western-blot en paral·lel amb extractes del llissat total (TCL) per comprovar els nivells de partida de Robo1 i Robo2 en totes les condicions experimentals (immunoprecipitats a l'esquerra del blot, IP; llissats totals a la dreta del blot, TCL). Es van utilitzar anticossos contra Myc (Robo1/2, panel superior) i FLAG (FLRT3, panel inferior). Veiem la interacció entre FLRT3 i Robo1 és específica (carril 2, panel superior) tant de proteïna sencera (fletxa superior) com de fragment processat de 130kDa (fletxa inferior). Per contra, no observem la banda corresponent a Robo2 (asterisc) en la condició on hi ha co-expressió de FLRT3 i Robo2 (carril 4, panel superior), tot i que sí que hi ha expressió de Robo2 en aquestes cèl·lules, com es veu en el llissat total (asterisc, carrils 7 i 8, panel superior). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). IP: immunoprecipitació i TCL: llissat total.

5. FLRT3 interacciona amb més afinitat amb un fragment de Robo1 que amb la proteïna sencera

Una observació interessant en els experiments de la **Figura 34** va ser que en els immunoprecipitats, a l'alçada dels ~120-130kDa (fletxa inferior), veiem una banda molt immunoreactiva que co-immunoprecipita amb gran afinitat amb FLRT3 (carrils 2, 4, 5 i 6, panel superior) (**Figura 34A**). La naturalesa d'aquesta banda no era clara, però vam

pensar que podria provenir d'un processament del receptor Robo1 per alguna activitat protelítica. En línies cel·lulars de càncer, PLC/PRF/5 i HepG2, es va veure per exemple com Robo1 és tallat a diferents nivells de manera consecutiva: en primer lloc a la part extracel·lular per metaloproteases deixant una forma del receptor ancorada a la membrana de 130kDa (Robo1-CTF1) i alliberant la part extracel·lular (Robo1-NTF); en segon lloc, a la part intracel·lular per γ -secretasa i alliberant un fragment intracel·lular de 120kDa (Robo1-CTF2) que pot ser degradat pel proteosoma i/o translocar-se al nucli [331][332]. S'ha arribat inclús a determinar l'estructura cristal·logràfica de la regió juxtamembrana extracel·lular del receptor necessària pel seu processament per metaloproteases. Aquesta regió té una estructura similar a la regió on s'uneix el lligand a receptors que controlen respostes de guia i que estan relacionats amb Robo1, Neogenina i DCC. A més a més, presenta un plegament compacte que probablement interfereix en l'accessibilitat de ADAM10 a la seqüència de tall, ja que quan es muta i el plegament no és tant compacte, s'incrementa la proteòlisi [333]. Els detalls i la funció d'aquest processament no estan clars, però en *D. melanogaster* s'ha descrit que el tall per la part extracel·lular de Robo1 està produït per la metaloproteasa ADAM10/Kuzbanian després d'unir-se a Slit, i que aquest tall és necessari perquè es desencadeni la resposta de repulsió [210]. En cèl·lules HEK293T sobreexpressores de Robo1, és molt probable que els mecanismes de processament de Robo1 estiguin actius espontàniament i donats els precedents, vam pensar que la banda que observàvem al voltant dels 130kDa podria ser el fragment processat de Robo1 que queda després del processament del receptor. Per comprovar si aquesta hipòtesi era certa vam generar una construcció en la què vam canviar l'etiqueta Myc de la part C-terminal de Robo1 a la part N-terminal per tal de veure si la immunoreactivitat es perdia en aquest cas quan co-immunoprecipitàvem amb FLRT3. Igual que en els experiments anteriors, vam comprovar que el nou receptor, Robo1-N-Myc, tingués una expressió cel·lular igual a la del receptor control Robo1-C-Myc (resultats no mostrats). Acte seguit, vam co-transfectar les cèl·lules HEK293T amb els següents plàsmids d'expressió:

Exp.: pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{N-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{N-Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

Per mirar la interacció vam fer un assaig de co-immunoprecipitació, els immunoprecipitats i els llisats totals els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i vam analitzar els resultats per western-blot amb anticossos específics contra Myc (Robo1) i contra FLAG (FLRT3) (**Figura 36**).

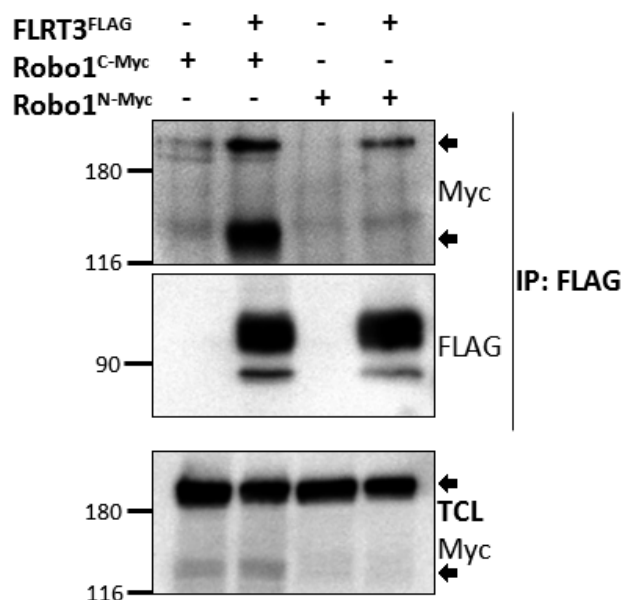


Figura 36 FLRT3 interacciona amb gran afinitat amb el fragment processat de Robo1 que inclou el seu ICD. Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb FLRT3^{FLAG}, Robo1-N-Myc (Myc en posició N-terminal) o Robo1-C-Myc (Myc en posició C-terminal) tal i com s'indica. Llisats d'aquestes cèl·lules es van immunoprecipitar amb la resina anti-FLAG (FLRT3) i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos contra Myc (Robo1, panel superior) i FLAG (FLRT3, panel central). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Myc (Robo1) per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem que el fragment de 130kDa immunoreactiu per Myc (fletxes inferiors, panel superior i inferior), només co-immunoprecipita amb FLRT3 quan Myc està en C-terminal de Robo1, indicant que aquesta banda és segurament un fragment processat de Robo1 que conté específicament la part intracel·lular de Robo1 (Robo1-CTFs). La posició

dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). IP: immunoprecipitat i TCL: llistat total.

Com s'ha mencionat, en aquest experiment preteníem veure com el fragment de 130kDa observat en les condicions on FLRT3 es co-expressava amb Robo1-C-Myc desapareixia quan s'utilitzava Robo1-N-Myc. D'aquesta manera tindríem evidències de l'especificitat d'aquesta banda, és a dir, que realment és un fragment de Robo1 i no una banda inespecífica reactiva per l'anticòs contra Myc que sempre co-immunoprecipita amb FLRT3.

El resultat va ser el que esperàvem i la banda molt immunoreactiva que apareix a una alçada de 130kDa amb Robo1-C-Myc (carril 2, fletxa inferior, panel superior) desapareix quan l'etiqueta està fusionada amb la part N-terminal de la proteïna (carril 4, fletxa inferior, panel superior) (**Figura 36**). Aquest experiment indica dues coses, primer que la banda de 130kDa que observem en la condició FLRT3+Robo1-C-Myc és un marcatge específic de l'anticòs contra Myc i segon, donat que en aquesta condició l'etiqueta està en la part C-terminal de la proteïna, que aquesta banda de 130kDa és la regió intracel·lular de Robo1 (**Figura 36**). Per tant, FLRT3 interacciona amb l'ICD de Robo1 tant amb la proteïna sencera com amb fragment processat, que conté l'ICD. Donat que els nivells al llistat total de la proteïna sencera (fletxa superior, panel inferior) són molt més elevats que els del fragment processat (fletxa inferior, panel inferior) (**Figura 36**) podem afirmar que la interacció entre FLRT3 i el fragment processat de Robo1 (Robo1-CTF) té molta més afinitat que la interacció entre FLRT3 i el receptor sencer, ja que els nivells de proteïna co-immunoprecipitada amb FLRT3 són a la inversa, molt més baixos per la proteïna sencera que pel fragment processat. Aquest Robo1-CTF no sabem si és únicament l'ICD del receptor o si també conté la regió transmembrana.

6. FLRT3 segresta Robo1-CTF a la membrana

Quan vam dur a terme l'experiment de la **Figura 33B i 33C** ens va semblar que quan Robo1 es co-expressava amb FLRT3 incrementava la seva localització en la membrana citoplasmàtica. Donat que fins el moment no sabíem res de la funcionalitat de la

interacció entre FLRT3 i Robo1, vam pensar que FLRT3 podria estar implicat en algun mecanisme d'estabilització de Robo1 en la membrana i fer que les neurones/axons siguin més sensibles o sensibles durant més temps al seu lligand, la molècula de guia axonal Slit.

Per tal d'adreçar aquesta qüestió vam fer diversos experiments. En primer lloc vam repetir la immunofluorescència en cèl·lules HEK293T abans esmentada, però aquesta vegada fixant-nos amb més detall en la localització cel·lular de Robo1 en presència de FLRT3. Vam transfectar les cèl·lules amb les següents combinacions de plàsmids d'expressió:

Exp.: pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

Després de fixar les cèl·lules, vam fer la immunofluorescència amb anticossos específics contra Myc (Robo1) i contra FLAG (FLRT3) (**Figura 37**). Vam visualitzar les cèl·lules amb confocal i vam agafar imatges de la secció central de cada cèl·lula per fer les quantificacions. D'aquesta manera vam perdre informació de la part superior i de la part inferior de la cèl·lula, però ens vam assegurar de que si apareixia marcatge en el interior de la cèl·lula seria realment citoplasmàtic. Per la quantificació vam establir dos grups d'acord amb la localització de Robo1: les cèl·lules que tenien expressió de Robo1 majoritàriament en la membrana (M), amb aparença similar a la cèl·lula de la **Figura 37B**, i les cèl·lules que tenien expressió de Robo1 tant en la membrana com en el citoplasma (M+C), amb aparença similar a la cèl·lula de la **Figura 37A**. Vam comptar les cèl·lules de cada grup en cada condició experimental i es va calcular el percentatge que representaven. Per tant, hi ha quatre grups de dades, grup control, Robo1-M i Robo1-M+C i grup FLRT3, Robo1+FLRT3-M i Robo1+FLRT3-M+C. És important mencionar que en la condició en què Robo1 estava co-expressat amb FLRT3, només vam quantificar aquelles cèl·lules que tinguessin expressió d'ambdues proteïnes.

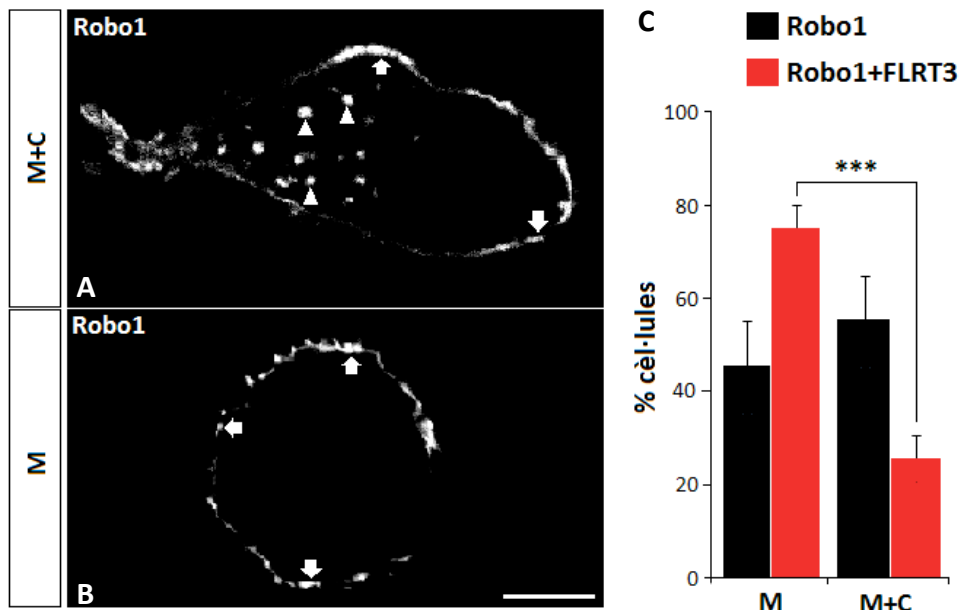


Figura 37 La co-expressió de FLRT3 amb Robo1 fa que aquest s'expressi majoritàriament en la membrana. A i B) Imatges representatives de cèl·lules HEK293T transfectades amb Robo1 sol (A) o amb Robo1+FLRT3 (B) processades per immunofluorescència acontra Myc (Robo1) i contra FLAG (FLRT3) i mostrant una localització mixta de membrana citoplasmàtica/intracel·lular (M+C, A) o bé una localització preferentment a la membrana citoplasmàtica (M, B). Caps de flexa senyalant la localització citoplasmàtica de Robo1 en A i fletxes senyalant la localització en la membrana citoplasmàtica de Robo1 en A i B. C) Quantificació del percentatge de cèl·lules que tenen una o altra distribució de Robo1 (M+C o M) en la condició de Robo1 sol (barres negres) o quan es co-expressa amb FLRT3 (barres vermelles). En Robo1 sol, un 45% de les cèl·lules expressen Robo1 únicament en la membrana i un 55% en ambdós localitzacions, membrana i citoplasma (comparació de mitjanes $P > 0,05$; t-student). En la condició Robo1+FLRT3, veiem que un 75% de les cèl·lules expressen Robo1 únicament en la membrana i un 25% en ambdós localitzacions, membrana i citoplasma (comparació de mitjanes $***P < 0,001$; t-student). Dades presentades com la mitjana + SEM de tres experiments, en cada condició de cada experiment es van recomptar 20-30 cèl·lules. Escala 10 μ m. M: membrana i M+C: membrana més citoplasma.

El resultat d'aquest experiment va confirmar les nostres observacions prèvies. Quan Robo1 s'expressa sol es localitza tant en la membrana com en el citoplasma, amb un 45% de cèl·lules que expressen Robo1 únicament en la membrana i un 55% que l'expressen tant en la membrana com en el citoplasma sense que hi hagi diferències significatives entre els dos grups (**Figura 37A i 37C**). Per contra, quan Robo1 es co-expressa amb FLRT3 el percentatge de cèl·lules on veiem Robo1 únicament expressat en la membrana incrementa considerablement i de manera significativa fins un 75%, mentre que el percentatge de cèl·lules que expressen Robo1 en la membrana i el

citoplasma disminueix fins un 25% (**Figura 37B i 37C**). També observem l'increment del percentatge de cèl·lules que expressen Robo1 només en membrana en la condició on es co-expressa amb FLRT3, passa d'un 45% a un 75%, i la disminució del percentatge de cèl·lules que expressen Robo1 en la membrana i el citoplasma quan aquest es co-expressa amb FLRT3, passa d'un 55% a un 25%, tot i que aquestes diferències no són estadísticament significatives, $p=0,0574$ i $p=0,0589$, respectivament.

D'aquesta manera amb aquest experiment vam poder concloure que d'alguna manera la presència de FLRT3 fa que Robo1 estigui localitzat majoritàriament en la membrana citoplasmàtica. Una possibilitat que podria explicar aquest resultat és que la immunoreactivitat intracel·lular fos deguda a Robo1-CTF i que la presència de FLRT3 impedisés el processament del receptor. No obstant, vam descartar aquesta possibilitat donat que per western-blot vèiem el fragment de 130kDa quan FLRT3 estava co-expressat (veure **Figura 36**, panel inferior, TCL). Per tant, en aquest punt ens interessava saber si l'increment de localització a membrana que observàvem en presència de FLRT3 corresponia al receptor sencer o bé al fragment de Robo1 que es processa i amb el que FLRT3 interacciona amb més afinitat (Robo1-CTF). Ressoldre aquesta qüestió era important per començar a comprendre la possible funcionalitat de la interacció FLRT3-Robo1. Si fos el receptor sencer, el resultat anterior podria estar indicant que FLRT3 d'alguna manera intervé en el tràfic del receptor a la membrana. Però, si fos Robo1-CTF significaria que FLRT3 l'estaria segrestant en la membrana i podria modular així la seva activitat, fet que podria ser interessant ja que tal i com s'ha descrit la generació de Robo1-CTF és important per la senyalització del receptor [331][210][333].

Per tal d'estudiar quina forma del receptor es movilitzava de la membrana al citoplasma en absència de FLRT3, vam aprofitar les construccions de Robo1 amb l'etiqueta Myc a l'extrem N-terminal i C-terminal de la proteïna i vam transfectar així cèl·lules HEK293T amb les següents combinacions de plàsmids d'expressió:

Exp.: pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{N-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{N-Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

Posteriorment vam fer la immunofluorescència amb anticossos específics contra Myc (Robo1) i contra FLAG (FLRT3) (**Figura 38**).

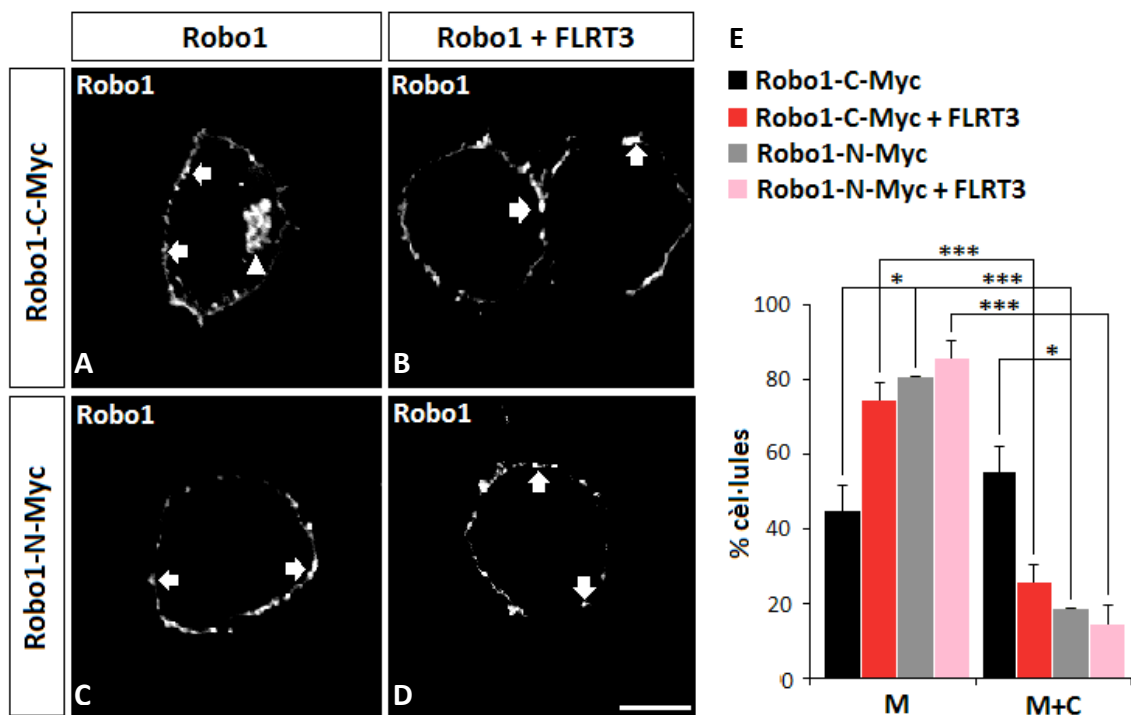


Figura 38 El marcatge citoplasmàtic de Robo1 és majoritàriament el fragment processat que conté el seu ICD. A-D) Imatges representatives de cèl·lules HEK293T transfectades amb Robo1 sol (C-Myc, A; N-Myc, C) o amb Robo1+FLRT3 (C-Myc, B; N-Myc, D) processades per immunofluorescència contra Myc (Robo1) per mostrar la localització cel·lular de Robo1. Caps de fletxa senyalant la localització citoplasmàtica de Robo1 en A i fletxes senyalant la localització en la membrana citoplasmàtica de Robo1 en A, B, C i D. E) Quantificació del percentatge de cèl·lules que tenen una distribució mixta, membrana+citoplasma (M+C), o només de membrana (M) en les condicions indicades (barra negra, Robo1-C-Myc sol; barra vermella, Robo1-C-Myc + FLRT3; barra gris, Robo1-N-Myc sol; barra rosa, Robo1-N-Myc + FLRT3. Com en els experiments anteriors, en el cas de Robo1-C-Myc sol, el percentatge de cèl·lules que expressen Robo1 en la membrana no és diferent estadísticament al percentatge que l'expressen en la membrana i en el citoplasma (barres negres, $p > 0,05$), però sí quan es co-expressa FLRT3 (barres vermelles, $***p < 0,001$). En el cas de Robo1-N-Myc, ja existeixen diferències significatives

en la distribució de Robo1 quan s'expressa sol (barres grises, *** $p < 0,001$) que no es modifiquen i continuen sent significatives amb presència de FLRT3 (barres roses, $p < 0,001$). Dades presentades com la mitjana + SEM de tres experiments, en cada condició es van recomptar 20-30 cèl·lules. Comparació de mitjanes, * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$, t-student. Escala 10 μ m. M: membrana i M+C: membrana més citoplasma.

Amb la construcció Robo1-C-Myc hauríem de veure el resultat que havíem vist fins aleshores, és a dir, localització en membrana i en el citoplasma (era el nostre control), però amb la construcció Robo1-N-Myc hi havia dos resultats possibles depenent si era el receptor sencer o la forma processada: un que Robo1-N-Myc tingués la mateixa localització que a l'utilitzar Robo1-C-Myc, fet que indicaria que el marcatge citoplasmàtic és el receptor sencer, i dos que Robo1-N-Myc només es veiés en la membrana, fet que indicaria que el marcatge que veiem en el citoplasma a l'utilitzar Robo1-C-Myc és majoritàriament la forma processada.

El resultat d'aquest experiment en les condicions Robo1 i Robo1+FLRT3 amb l'etiqueta myc a la part intracel·lular va ser el que ja havíem observat, que quan Robo1-C-Myc es co-expressa amb FLRT3 es localitza majoritàriament en la membrana citoplasmàtica, mentre que quan s'expressa sol es localitza tant en la membrana com en la membrana i el citoplasma (**Figura 38A, 38B i 38E**). Per contra, en la condició on Robo1 porta l'etiqueta en la part N-terminal el marcatge que predomina en la majoria de les cèl·lules és únicament en la membrana independentment de la co-expressió amb FLRT3 (**Figura 38C, 38D i 38E**). Per tant, aquests resultats indiquen que el marcatge citoplasmàtic que veiem en la condició Robo1-C-Myc és majoritàriament la forma processada del receptor, Robo1-CTF. De fet, ja veiem diferències significatives en l'expressió a membrana i en l'expressió a membrana més citoplasma entre les condicions Robo1-C-Myc i Robo1-N-Myc, el què ja indica que el marcatge citoplasmàtic en cèl·lules amb Robo1-C-Myc és el fragment processat de Robo1 (**Figura 38E**).

En aquest punt, podem resumir algunes de les observacions més importants que hem fet. D'una banda, aquests experiments demostren que Robo1 en cèl·lules HEK293T transfectades és processat independentment de lligand, possiblement degut a l'efecte de la sobreexpressió. I d'altra banda, i donat que el marcatge citoplasmàtic apareix gairebé únicament en la condició Robo1 i no en la condició Robo1+FLRT3 i que en la

Figura 34A i Figura 35 veiem que FLRT3 interacciona amb més afinitat amb el fragment processat de Robo1, podem concloure que quan FLRT3 es co-expressa amb Robo1 el fragment processat que es genera, Robo1-CTF, queda segrestat en la membrana degut a la interacció amb FLRT3.

7. Processament de Robo1 en cèl·lules HEK293T

Els resultats ens suggerien que FLRT3 podria estar controlant l'activitat del receptor mitjançant la interacció amb Robo1 i el segrest del seu fragment processat la membrana. La següent pregunta que ens vam fer va ser si el processament de Robo1 i aquesta funció de FLRT3 sobre aquest receptor podria estar regulada pel seu lligand natural, Slit. Per adreçar aquesta qüestió, vam transfectar cèl·lules HEK293T amb les següents combinacions de plàsmids d'expressió:

Exp. pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

I vam estimular-les amb concentracions saturants de Slit1 a diferents temps: 0', 5', 10', 20', 40' i 90'. Posteriorment, vam realitzar una immunoprecipitació, els lligats totals i els immunoprecipitats els vam ressoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i vam analitzar els resultats per western-blot amb anticossos específics contra Myc (Robo1) i contra FLAG (FLRT3) (**Figura 39**).

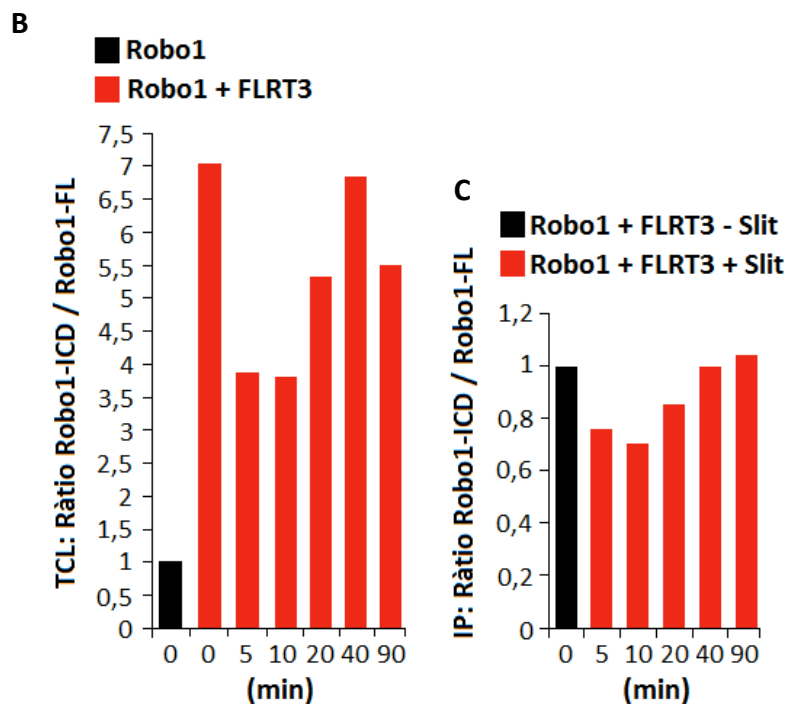
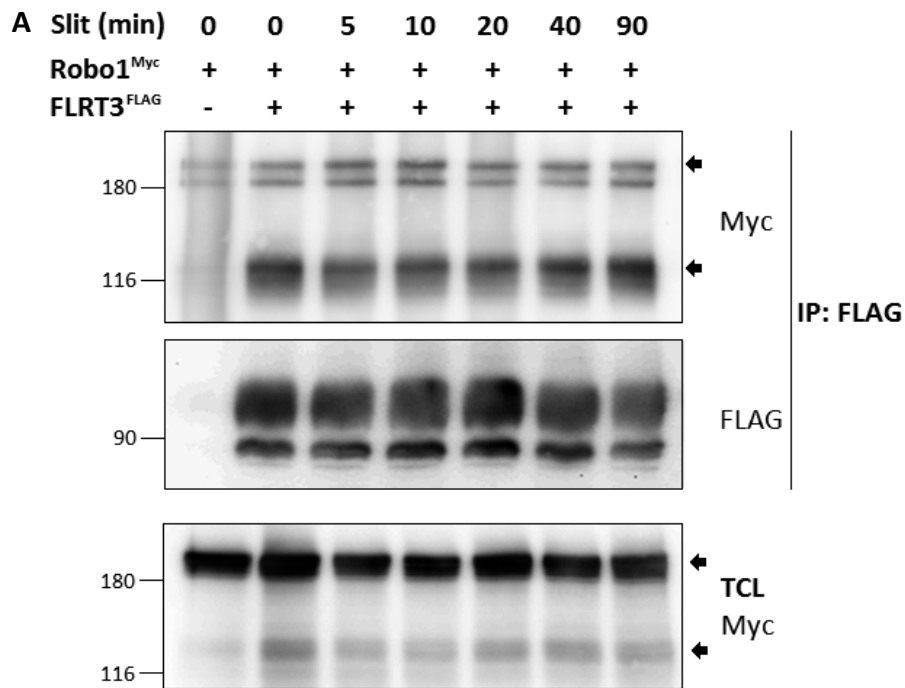


Figura 39 FLRT3, però no Slit1 estimula el processament de Robo1 en cèl·lules HEK293T transfectades.

A) Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb FLRT3^{FLAG} i/o Robo1-C-Myc i es van estimular amb Slit1 durant diversos temps (0, 5, 10, 20, 40 i 90 minuts) tal i com s'indica. Llisats d'aquestes cèl·lules es van immunoprecipitar amb la resina anti-FLAG (FLRT3) i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos contra Myc (Robo1, panel superior) i contra FLAG (FLRT3, panel central). Extractes del llistat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Myc (Robo1, panel inferior) per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem que la

presència de Slit1 no fa que la interacció entre FLRT3 i Robo1 es perdi (carrils 2, 3, 4, 5, 6 i 7, panel superior, fletxa superior) i tampoc la interacció entre FLRT3 i Robo1-CTF (carrils 2, 3, 4, 5, 6 i 7, panel superior, fletxa inferior). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). B) Quantificació dels nivells de Robo1-CTF respecte els nivells de Robo1, proteïna sencera, depenent de la co-expressió de FLRT3 (barres vermelles) o no (barra negra), condició que pren el valor 1. La quantificació es va realitzar en ImageJ tenint en compte els píxels de cadascuna de les bandes (panel inferior en A), en aquest cas els nivells no es van corregir. Veiem com només la co-expressió de FLRT3 fa que hi hagi més processament i si no tenim en compte la condició Robo1+FLRT3-Slit1, ja que la càrrega és major i no està corregida, hi ha una tendència a haver-hi més processament de Robo1 quan més temps estimulem amb Slit1. C) Quantificació dels nivells de co-immunoprecipitació amb FLRT3 de Robo1-CTF respecte la proteïna sencera depenent de la presència de Slit1 (barres vermelles) o no (barra negra), condició que pren el valor 1. La quantificació es va fer en ImageJ tenint en compte els píxels de cadascuna de les bandes i els nivells a l'immunoprecipitat, es va corregir pels nivells de proteïna de partida al llisat total (panel inferior en A). FLRT3 interacciona amb Robo1-CTF independentment de la presència o no de Slit1, tot i que a als temps 5 i 10 minuts d'estimulació hi ha una petita disminució en aquesta interacció. Dades corresponents a un únic experiment. IP: immunoprecipitat i TCL: llisat total. Slit1 (0,25µg/mL).

En aquest experiment d'una banda veiem que la presència de Slit1 no modula ni la interacció entre FLRT3 i Robo1 sencer (del carril 2 al 7, panel superior, fletxa superior) ni la interacció de FLRT3 amb Robo1-CTF, el fragment processat del receptor, (del carril 2 al 7, panel superior, fletxa inferior) (**Figura 39A**). I sorprenentment tampoc veiem que hi hagi correlació entre el temps d'estimulació amb Slit1 i la quantitat de Robo1-CTF generat (**Figura 39B**). Tot i que si no tenim en compte la condició Robo1+FLRT3 sense Slit1 sí que s'observa una tendència a haver-hi més generació de Robo1-CTF quan més temps estimulem amb Slit1, sent el temps d'estimulació 40 minuts quan més Robo1-CTF es genera. En aquesta condició, Robo1+FLRT3 sense Slit1, sembla haver-hi més càrrega en el wester-blot i això fa que la senyal detectada amb l'anticòs contra Myc sigui més intensa que en les altres condicions, fet que podria estar emmascarant el resultat real. Malauradament aquest experiment no es va poder repetir i per tant, no podem saber del cert si Slit1 promou el processament de Robo1 en les cèl·lules HEK293T transfectades amb el receptor. Per estudiar millor aquest mecanisme hauríem d'haver treballat en cèl·lules transfectades únicament amb Robo1, per evitar l'efecte de FLRT3 sobre el processament. Ja que sorprenentment, el que sí veiem en aquesta quantificació és que la simple co-expressió de FLRT3 amb Robo1 fa que hi hagi

un gran increment en el processament de Robo1 (**Figura 39B**), això podria ser degut a que la interacció de FLRT3 amb el receptor genera un canvi de conformació en Robo1 que fa que sigui més fàcilment processat.

Per últim, en aquest experiment tampoc vam observar que la presència de Slit1 tingués cap efecte sobre la interacció entre FLRT3 i Robo1-CTF (**Figura 39C**). Resultat previsible donat que l'estimulació amb Slit1 de les cèl·lules HEK293T transfectades amb Robo1 no promou el processament del receptor. Tot i que sí veiem una petita disminució en aquesta interacció en els temps d'estimulació 5 i 10 minuts (**Figura 39C**).

Per tant, amb aquest experiment vam poder concloure amb certesa dues coses: una que Slit1 no trenca la interacció entre FLRT3 i Robo1 i tampoc entre FLRT3 i Robo1-CTF i dues que la simple co-expressió de FLRT3 amb Robo1 fa que hi hagi un increment en el processament del receptor.

En aquest experiment un dels resultats obtinguts va ser que la simple co-expressió de FLRT3 amb Robo1 fa que hi hagi un increment en la generació de Robo1-CTF, suggerint que FLRT3 indueix la proteòlisi de Robo1. Per tal de comprovar aquest resultat vam realitzar un experiment de biotinització de Robo1, en absència o presència de FLRT3 i per això vam transfectar les cèl·lules HEK293T amb les següents combinacions de plàsmids d'expressió:

Exp.: pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3MycHisC+-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

Posteriorment, vam marcar totes les molècules de la superfície cel·lular amb biotina, molècula que s'unix als grups amina de les proteïnes, i vam fer una precipitació utilitzant una resina unida a estreptavidina, molècula que s'uneix amb gran afinitat a la biotina. Els llistats totals i els immunoprecipitats els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i els resultats es van analitzar per western-blot amb anticossos específics contra Myc (Robo1) i contra FLAG (FLRT3) (**Figura 40**). Amb aquesta tècnica aconseguiríem veure si Robo1 co-expressat amb FLRT3 es processava més que quan s'expressa sol. Si això fos cert, els nivells de Robo1 sencer haurien de reduir-se

significativament en presència de FLRT3, corroborant així el resultat de la **Figura 39B**.

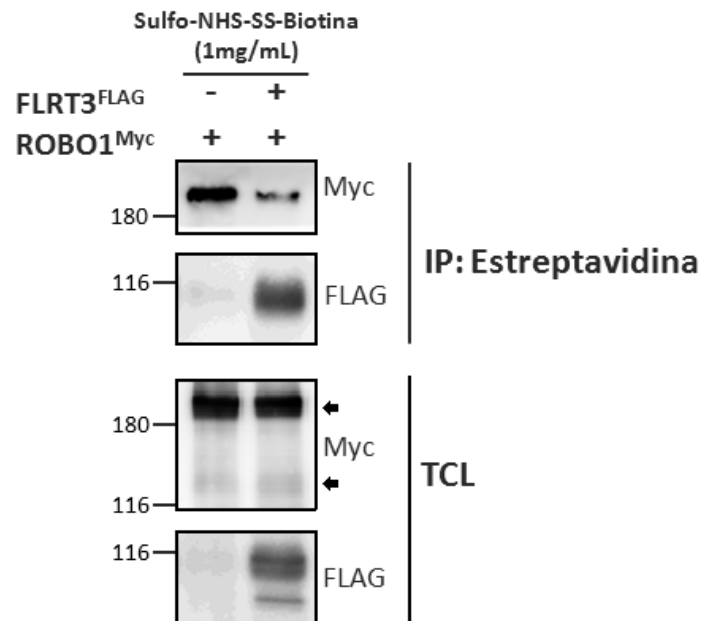


Figura 40 FLRT3 promou el processament de Robo1. Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb Robo1-C-Myc i/o FLRT3^{FLAG} i es van marcar les proteïnes de superfície amb biotina tal i com s'indica. Llisats totals d'aquestes cèl·lules es van immunoprecipitar amb una resina unida a estreptavidina i els complexes es van analitzar per western-blot amb anticossos contra Myc (Robo1, panel superior) i contra FLAG (FLRT3, segon panel superior). Extractes del llistat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Myc (fletxa superior Robo1, fletxa inferior Robo1-CTF, tercer panel) i contra FLAG (FLRT3, panel inferior) per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem que la co-expressió de FLRT3 amb Robo1 (carril 2, panel superior) fa que aquest últim es processa amb una taxa major. També observem que en la condició FLRT3+Robo1 hi ha més generació de Robo1-CTF (carril 2, tercer panel). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). IP: immunoprecipitat i TCL: llistat total.

Com veiem en el western-blot de l'assaig de biotinització (**Figura 40**) la co-expressió de FLRT3 estimula d'alguna manera el processament de Robo1, ja que la senyal de la banda corresponent a Robo1, receptor sencer, en la condició Robo1+FLRT3 (carril 2, panel superior) és de menor intensitat que en la condició Robo1 sol (carril 1, panel superior) (**Figura 40**). A més a més, també observem que en la condició FLRT3+Robo1 hi ha més generació de Robo1-CTF (carril 2, fletxa inferior, tercer panel). Tenint en compte aquest resultat juntament amb l'experiment de la figura anterior (**Figura 39B**) podem concloure que, FLRT3 per mitjà d'algun mecanisme que desconeixem, promou

el processament de Robo1. No sabem perquè la presència de FLRT3 fa que aquest processament s'incrementi, una explicació podria ser que la interacció entre FLRT3 i Robo1 fa que es produeixi un canvi de conformació en el receptor i que llavors sigui més susceptible a ser processat.

Sabent que Robo1 és processat en les cèl·lules HEK293T vam voler identificar la regió per on és tallat construint diversos mutants de deleció de la regió descrita que inclou el punt de tall per metaloproteases [331]. Malauradament, però, no vam tenir èxit en la seva construcció ja que el cDNA que codifica pel receptor és molt gran, més de 5000bp, i no aconseguíem amplificar-lo en la PCR. Vam intentar provar amb el mètode de mutagènesi dirigida "megaprimer", però tampoc vam tenir èxit ja que teníem problemes en la lligació i/o transformació del vector resultant, més de 10000bp. Donat aquesta impossibilitat tècnica a l'hora de generar els mutants, no vam poder identificar la regió per on el receptor és processat ni generar eines que ens haguessin permès estudiar funcionalment les implicacions d'aquest processament. Alternativament, vam utilitzar una aproximació farmacològica per estudiar si l'increment del processament de Robo1 en presència de FLRT3, depenia d'una activitat metaloproteasa. Existeixen diverses drogues que inhibeixen l'activitat de les metaloproteases, una d'elles és TAPI-1. Vam transfectar les cèl·lules HEK293T amb Robo1 o Robo1+FLRT3 i vam aplicar aquesta droga durant 20 hores a partir de la transfecció, posteriorment vam fer una immunoprecipitació amb la resina anti-FLAG (FLRT3) i vam resoldre els immunoprecipitats i els llistats totals mitjançant electroforesi SDS-PAGE i anticossos específics contra Myc (Robo1) i contra FLAG (FLRT3) (resultat no mostrat). Vam repetir l'experiment diversos cops, però en cap d'ells vam obtenir un resultat coherent ja que semblava que amb la droga en comptes d'inhibir el processament l'estàvem incrementant. Per tot això vam deixar de buscar en aquesta direcció i ens vam centrar en la possible funció biològica de la interacció FLRT3-Robo1.

8. Interacció de FLRT3 i Robo1 en el tàlem

Fins el moment havíem caracteritzat la interacció entre FLRT3 i Robo1, sabíem que ambdós proteïnes interaccionen amb el seu domini intracel·lular i que FLRT3, a més a

més, interacciona amb gran afinitat amb Robo1-CTF. A més, FLRT3 incrementava el processament de Robo1 i el fragment generat, Robo1-CTF, es quedava segrestat a la membrana, possiblement degut a la interacció amb FLRT3. Per tal de conèixer la possible funció biològica d'aquesta interacció FLRT3-Robo1, vam fer una cerca per identificar les zones del cervell de ratolí on ambdues proteïnes coexisteixen en el temps, especialment durant el desenvolupament.

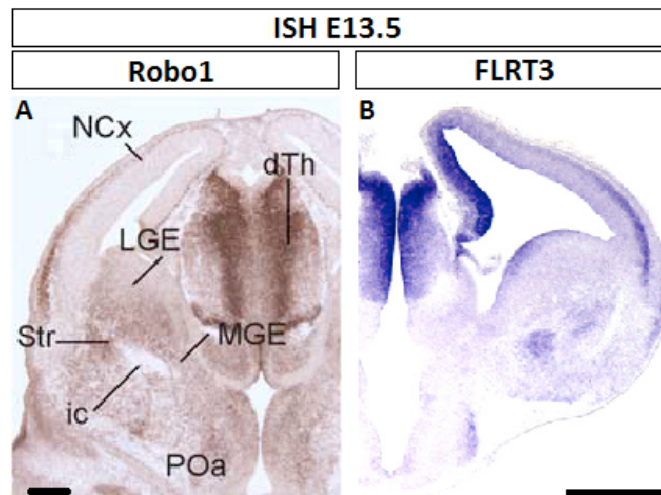


Figura 41 FLRT3 i Robo1 es co-expressen en el tàlem durant el desenvolupament del cervell de ratolí. Hibridació *in situ* (ISH) de *Robo1* (A, adaptada de la referència [241]) i *FLRT3* (B, adaptada de la referència [334]) en una secció coronal de cervell de ratolí en estadi E13.5 del desenvolupament. En aquestes dues ISH podem observar com *FLRT3* i *Robo1* es co-expressen en similars regions en el tàlem. Escala de A 300µm i escala de B 1mm. ISH: hibridació *in situ*, NCx: escorça en desenvolupament, dTh: tàlem dorsal, LGE: eminència ganglionar lateral, Str: estriat, ic: càpsula interna, MGE: eminència ganglionar medial i Poa: àrea pre-òptica.

Vam veure que a estadi E13.5 *FLRT3* i *Robo1* tenen certa co-expressió en el tàlem i també en l'escorça (**Figura 41**). A més a més, havíem vist en resultats previs del nostre laboratori que la proteïna FLRT3 tenia una expressió gradual en el tàlem, sent alta en el tàlem rostral i baixa en el tàlem intermedi (**Figura 42**). Els axons talamocorticals (TCA) estan distribuïts de manera topogràfica i per tant, aquest gradient d'expressió de FLRT3 en el tàlem podria estar indicant possible funció de FLRT3 en aquesta regió, potser juntament amb Robo1.

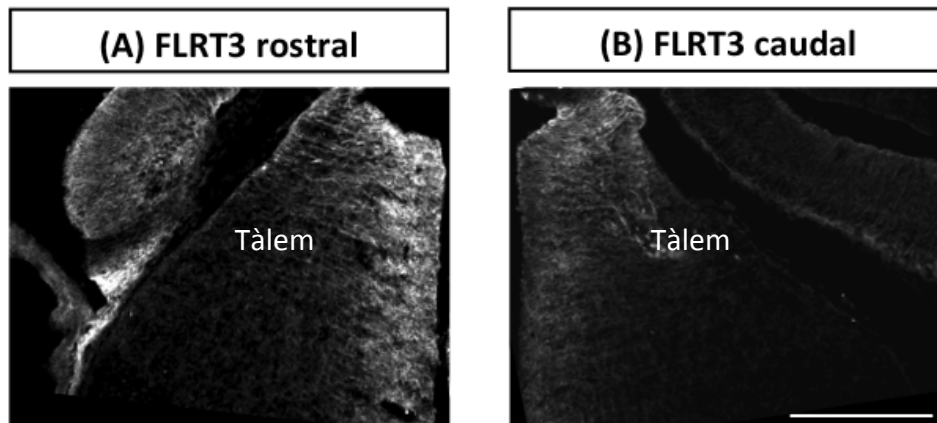


Figura 42 Expressió gradual de FLRT3 en el tàlem en desenvolupament. Immunofluorescència de FLRT3 en seccions coronals de cervell de ratolí en estadi del desenvolupament E14.5 on es visualitza el tàlem dorsal, rostral en A i caudal en B. Veiem com FLRT3 té una expressió gradual en el tàlem, sent més intensa en la part rostral i menys en la part caudal. Escala en A i B 400µm. Imatge pertanyent al nostre grup: Molecular and Developmental Neurobiology.

Després d'obtenir tota aquesta informació sobre l'expressió de FLRT3 i Robo1 en el tàlem vam voler veure si la interacció que havíem descrit en cèl·lules HEK293T tenia lloc en un context més fisiològic com podria ser les neurones del tàlem. Així, vam fer cultius primaris de la part rostral del tàlem (on l'expressió de FLRT3 és més intensa) en estadi E13.5 i després de dos dies de cultiu *in vitro* (2DIV) vam fer una immunoprecipitació amb un anticòs contra FLRT3. Prèviament havíem optimitzat aquesta immunoprecipitació en HEK293T transfectades per tal de que la quantitat de Robo1 que co-immunoprecipitava amb FLRT3 fos la màxima possible. Això ho vam aconseguir modificant les concentracions de NaCl, de 150mM a 25mM, i canviant de detergent, de 1% Tritó-X100 a 0,1% SDS. Els immunoprecipitats i els llisats totals els vam resoldre en electroforesi SDS-PAGE i van analitzar els resultats per western-blot amb anticossos específics contra Robo1 i contra FLRT3 (**Figura 43**).

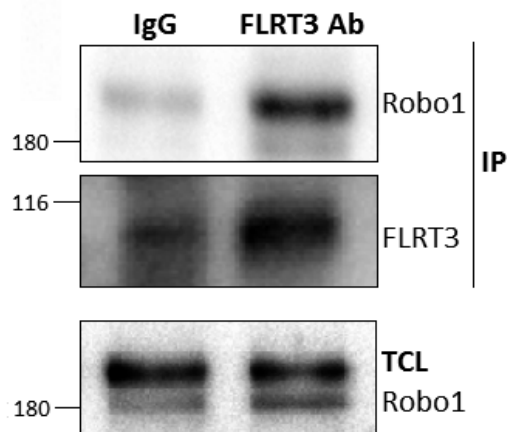


Figura 43 Robo1 sencer co-immunoprecipita amb FLRT3 en cultiu de neurones talàmiques. Neurones talàmiques rostrals es van cultivar durant dos dies *in vitro* (2DIV). Es va determinar la proteïna total dels llisats d'aquests cultius mitjançant el mètode Bradford i els mateixos μg del llisat de cada condició experimental es van incubar amb l'anticòs contra FLRT3 (FLRT3 Ab) o amb IgGs de cabra (IgG) com a control. Posteriorment, aquests llisats es van immunoprecipitar utilitzant una combinació de la resina Protein A Sepharose i Protein G Sepharose i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos específics contra Robo1 (panel superior) i FLRT3 (panel central). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Robo1 (panel inferior) per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem que Robo1 sencer co-immunoprecipita amb FLRT3 (carril 2, panel superior), és a dir, FLRT3 i Robo1 interaccionen en neurones talàmiques rostrals en cultiu. La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). IgG: immunoglobulines control de cabra, FLRT3 Ab: anticòs contra FLRT3 de cabra, IP: immunoprecipitat i TCL: llisat total.

Com veiem en el western-blot de la **Figura 43** per fer la immunoprecipitació vam utilitzar l'anticòs anti-FLRT3 fet en cabra i com a control vam utilitzar IgGs de cabra. Amb aquest control podríem veure, en el cas de que aparegués la banda de Robo1, si aquesta era específica o inespecífica, és a dir, si la vèiem perquè realment co-immunoprecipitava amb FLRT3, o al contrari, perquè interaccionava de forma inespecífica amb l'anticòs. Tot i que apareix una banda molt tènue a l'alçada del pes molecular de Robo1 en la immunoprecipitació control, el senyal de la mateixa banda quan utilitzem l'anticòs específic anti-FLRT3 és molt més intensa. Per tant, a partir d'aquest experiment vam poder concloure que FLRT3 i Robo1 interaccionen en el tàlem rostral de manera específica a estadi del desenvolupament E13.5. Aquest resultat era molt interessant ja que ens obria la porta a pensar que realment la interacció entre FLRT3 i Robo1 tenia alguna funció biològica *in vivo*, com per exemple,

en neurones talàmiques.

9. Processament de Robo1 per metaloproteases en el tàlem

Donat tot el que havíem descrit de la interacció FLRT3-Robo1 en cèl·lules HEK293T i que també havíem trobat la interacció en cèl·lules primàries vam voler veure si també en aquestes neurones talàmiques podíem observar alguns dels resultats obtinguts en les HEK293T.

En primer lloc vam voler veure si Robo1 era processat o no en aquestes neurones. Això era important ja que, fins l'actualitat, no hi ha cap estudi que demostrï que existeix processament de Robo1 en neurones de mamífer. L'únic que hi ha descrit és un estudi en *D. melanogaster* on s'observa que el processament de Robo1 és important perquè els axons creuin correctament la línia mitja [210], estudis en línies cel·lulars de càncer on es veu que Robo1 es processa i que el seu domini intracel·lular es transloca al nucli [332][331] i un estudi més recent on s'identifica l'estructura cristal·logràfica que ha de tenir la regió jxtamembrana del receptor perquè aquest es processa [333]. De tal manera que vam pensar que seria molt interessant poder veure si hi havia processament en neurones talàmiques.

Per estudiar el processament de Robo1 vam posar en cultiu neurones del tàlem rostral durant 2DIV i les vam estimular amb Slit1, lligand de Robo1, durant diversos temps: 0', 10', 20' i 40'. Quan Slit s'uneix a Robo1, es desencadena (almenys en *D. melanogaster*) el processament del receptor com a part del mecanisme de senyalització del receptor [210]. Aquest experiment ens permetria veure si Slit1 promovia el processament del receptor en aquest tipus neuronal i quan i durant quant de temps era capaç de generar aquesta resposta. Després de l'estimulació amb Slit1 vam lliar les cèl·lules i vam fer una immunoprecipitació utilitzant un anticòs contra Robo1 que reconeix una regió de la part intracel·lular del receptor i és capaç, doncs, de precipitar tant el receptor sencer com el fragment processat si aquest es generava. Els immunoprecipitats i els lliats totals els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i vam analitzar els resultats per western-blot amb l'anticòs específic contra Robo1 (el mateix que l'utilitzat en la

immunoprecipitació) (**Figura 44**).

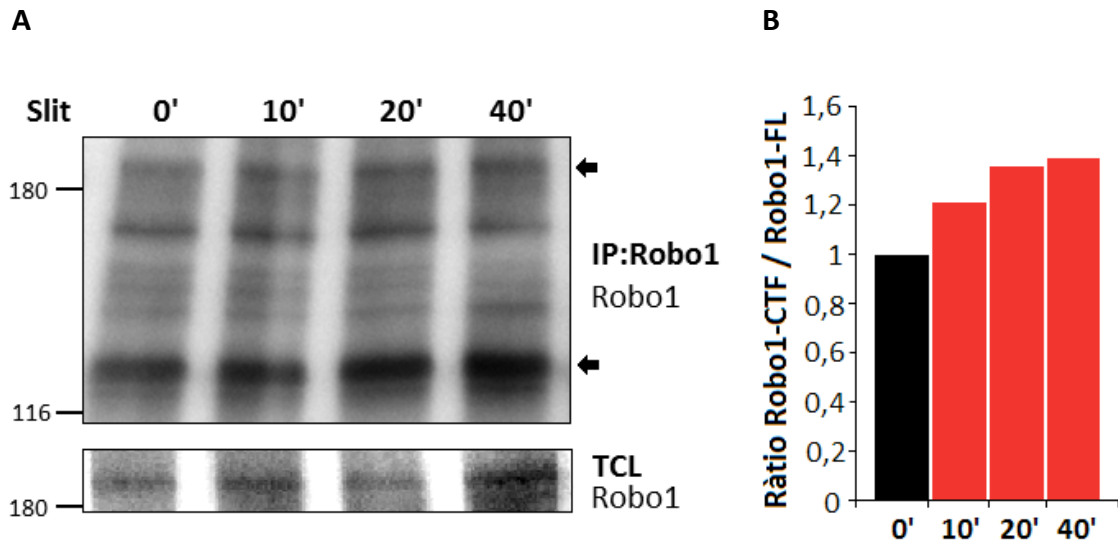


Figura 44 Robo1 és processat en neurones talàmiques després de l'estimulació amb Slit1. A) Neurones talàmiques rostrals es van cultivar durant dos dies *in vitro* (2DIV) i es van estimular amb Slit1 durant diferents temps tal i com s'indica. Es va determinar la proteïna total dels llisats d'aquests cultius mitjançant el mètode Bradford i els mateixos μg del llisat de cada condició experimental es van incubar amb l'anticòs contra Robo1. Posteriorment, aquests llisats es van immunoprecipitar utilitzant una combinació de la resina Protein A Sepharose i Protein G Sepharose i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos específics contra Robo1 (panel superior). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Robo1 (panel inferior) per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem un increment progressiu en la generació de Robo1-CTF (del carril 1 fins al carril 4, fletxa inferior) que correlaciona amb l'estimulació amb Slit1. La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). B) Quantificació dels nivells de co-immunoprecipitació de Robo1-CTF (en A, fletxa inferior, panel superior) respecte Robo1 sencer (en A, fletxa superior, panel superior) durant els diferents temps d'estimulació amb Slit1 (barres vermelles), sent el temps 0 minuts la condició control (barra negra) que pren el valor 1. La quantificació es va realitzar en ImageJ tenint en compte els píxels de cadascuna de les bandes i els nivells a l'immunoprecipitat, es va corregir pels nivells de proteïna de partida al llisat total (panel inferior en A). Dades corresponents a dos experiments pels temps 0 i 40 minuts i a un experiment pels temps 10 i 20 minuts. IP: immunoprecipitat i TCL: llisat total. Slit1 (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Després de l'estimulació de les neurones talàmiques amb Slit1 durant els diferents temps (0, 10, 20 i 40 minuts) veiem un increment en la intensitat de la banda corresponent a Robo1-CTF, fragment processat de Robo1, ~120-130kDa (**Figura 44A**, fletxa inferior). Creiem que aquesta banda és Robo1-CTF perquè té exactament el

mateix pes molecular que la banda que observem en els blots de cèl·lules HEK293T transfectades amb FLRT3 i Robo1 (**Figura 45**) i que hem confirmat que és un fragment que conté la part intracel·lular del receptor. A més a més, aquest increment correlaciona perfectament amb l'augment del temps de l'estimulació amb Slit1. És a dir, a mesura que anem estimulants durant més temps amb Slit1 anem veient una banda més intensa del fragment processat. En la quantificació també podem apreciar aquest fet, entre 0 i 10 minuts d'estimulació hi ha un increment del 10% en la quantitat de fragment processat que immunoprecipita i en els temps de 20 i 40 minuts d'estimulació aquest increment és del 40% (**Figura 44B**). Aquest curs temporal només es va fer un cop però, després es va fer l'experiment incloent només els temps 0 i 40 minuts d'estimulació. La quantificació mostrada a 0 i 40 minuts (**Figura 44B**) és de fet la mitjana dels dos experiments. Al no tenir tres repeticions no vam poder fer una estadística sòlida i saber si les diferències observades són significatives. No obstant, en els dos experiments realitzats sempre hem vist un increment del fragment processat de Robo1 després de 40 minuts d'estimulació amb Slit1 i és per això que creiem que en aquestes neurones talàmiques en cultiu es produeix el processament de Robo1.

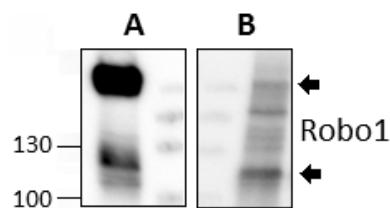


Figura 45 El fragment de Robo1, Robo1-CTF, en cèl·lules HEK293T i en neurones talàmiques. A) Llisats totals de cèl·lules HEK293T transfectades amb FLRT3^{C-FLAG} i Robo1-C-Myc es van resoldre mitjançant SDS-PAGE i es van analitzar per western-blot amb un anticòs específic contra Robo1 que reconeix una regió intracel·lular del receptor. B) Neurones talàmiques rostrals es van cultivar durant 2DIV, es van llsar i es va fer una immunoprecipitació utilitzant un anticòs contra Robo1, que reconeix una regió intracel·lular del receptor, i una combinació de la resina Protein A Sepharose i Protein G Sepharose. Els immunoprecipitats es van resoldre per electroforesi SDS-PAGE i es van analitzar per western-blot amb un anticòs específic contra Robo1, que reconeix una regió intracel·lular del receptor (és el mateix que l'utilitzat en A). Fletxa superior indicant Robo1 sencer i fletxa inferior indicant el fragment Robo1-CTF. Veiem com el fragment processat de Robo1, Robo1-CTF (fletxa inferior), en el blot dels llsats totals de les cèl·lules HEK293T transfectades amb FLRT3+Robo1 (A) té aproximadament el mateix pes molecular que la banda que surt en el blot de la immunoprecipitació de llsats de neurones talàmiques (B), ja que la distància entre aquesta banda i la banda corresponent als 130kDa del marcador de pesos moleculars

és la mateixa en els dos blots i el marcador de pesos moleculars de cada blot ha corregut igual en cada cas. La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra del blot (en kDa). A la dreta de A i a l'esquerra de B veiem les bandes del marcador de pesos moleculars utilitzat.

La conclusió que podem extreure d'aquest experiment és que Robo1 es processa en neurones talàmiques en cultiu i que aquest processament és induïble per Slit1. És a dir, hi ha processament del receptor de forma Slit1 dependent, fet mai demostrat fins aquest moment.

En segon lloc, vam voler estudiar si a l'igual que passa en les cèl·lules HEK293T aquest fragment processat de Robo1 també interacciona amb gran afinitat amb FLRT3 ja que d'aquesta manera ens estaria donant alguna pista sobre la possible funció de la interacció entre FLRT3 i Robo1 en neurones primàries.

Per veure si aquesta interacció tenia lloc en aquest tipus neuronal vam posar en cultiu neurones talàmiques rostrals durant 2DIV i vam fer una immunoprecipitació amb un anticòs contra FLRT3. Els immunoprecipitats i els llisats totals els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i es van analitzar per western-blot amb anticossos específics contra FLRT3 i contra Robo1 (el qual reconeix una regió intracel·lular del receptor) (**Figura 46**).

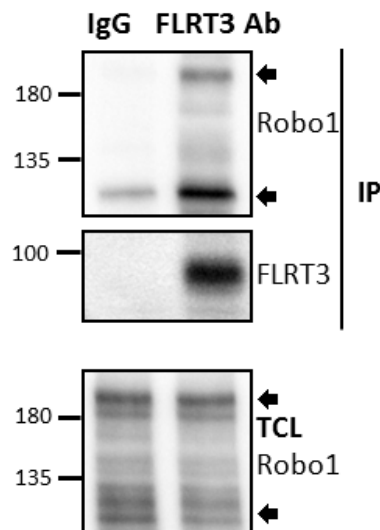


Figura 46 FLRT3 interacciona amb el fragment Robo1-CTF en neurones talàmiques. Neurones talàmiques rostrals es van cultivar durant dos dies *in vitro* (2DIV). Es va determinar la proteïna total dels llisats d'aquests cultius mitjançant el mètode Bradford i els mateixos µg del llisat de cada condició experimental es van incubar amb l'anticòs contra FLRT3 (FLRT3 Ab) o amb IgGs de cabra (IgG) com a

control. Posteriorment, aquests llisats es van immunoprecipitar utilitzant una combinació de la resina Protein A Sepharose i Protein G Sepharose i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos específics contra Robo1 (panel superior) i FLRT3 (panel central). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Robo1 (panel inferior) per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Com ja havíem vist en la **Figura 36** Robo1 (proteïna sencera) co-immunoprecipita amb FLRT3 (carril 2, fletxa superior) i, a més a més, també co-immunoprecipita el fragment Robo1-CTF (carril 2, fletxa inferior). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). IgG: immunoglobulines de cabra, FLRT3 Ab: anticòs contra FLRT3 (produït en cabra), IP: immunoprecipitat i TCL: llisat total.

Com podem apreciar en la **Figura 46** (carril 2, panel superior) i tal com havíem demostrat anteriorment (**Figura 43**), Robo1 (proteïna sencera) co-immunoprecipita amb FLRT3, fletxa superior. Curiosament, i a més a més, també precipita una banda que té l'alçada esperada del fragment processat de Robo1 i que és reconeguda per l'anticòs contra Robo1 (fletxa inferior, panel superior) (**Figura 46**).

En la condició control on es va fer la immunoprecipitació amb IgGs de cabra no detectem cap banda corresponent al receptor sencer (carril 1, fletxa superior, panel superior) (**Figura 46**), fet que demostra l'especificitat de la unió Robo1 amb FLRT3. Per contra, sí que detectem una lleugera banda a l'alçada del fragment Robo1-CTF, tot indicant que aquest fragment té una certa unió inespecífica a les IgGs de cabra o bé que es tracta d'una senyal completament inespecífica (carril 1, fletxa inferior, panel superior) (**Figura 46**). En qualsevol cas, com que aquesta banda és de molta menys intensitat que la que veiem en la condició on fem la immunoprecipitació utilitzant l'anticòs contra FLRT3, podem afirmar que aquest gran increment en la intensitat de la banda és degut únicament a la interacció específica amb FLRT3. A més a més, si comparem els nivells d'expressió del receptor sencer i del fragment processat (carril 2, panel inferior) amb els nivell detectats en la immunoprecipitació (carril 2, panel superior) veiem que, a l'igual que passava en les cèl·lules HEK293T, la interacció entre FLRT3 i Robo1-CTF és de més afinitat, ja que en els llisats totals detectem més quantitat de Robo1 que de Robo1-CTF i en els immunoprecipitats és a l'inversa, la banda corresponent al fragment processat (fletxa inferior) és més intensa que la banda corresponent al receptor sencer (fletxa superior) (**Figura 46**).

Per tant, amb aquest experiment vam confirmar un dels resultats obtinguts en les cèl·lules HEK293T, que FLRT3 a part d'interaccionar amb Robo1-FL també interacciona amb el seu fragment intracel·lular, sent aquesta interacció de major afinitat. Aquest resultat és molt interessant perquè suggereix amb una alta probabilitat que FLRT3 té algun paper sobre la funcionalitat/senyalització de Robo1 en el tàlem.

En tercer lloc, vam voler estudiar si a l'estimular aquestes neurones amb Slit1 durant 40 minuts, fet que havíem vist que incrementava el processament de Robo1, hi havia un increment en la interacció entre FLRT3 i Robo1-CTF. Si fos així seria indicatiu de que FLRT3, com passa en les cèl·lules HEK293T, està segregant aquest fragment.

Per veure si aquest procés tenia lloc vam posar en cultiu neurones talàmiques rostrals durant 2DIV, vam estimular-les o no amb Slit1 durant 40 minuts i vam fer una immunoprecipitació amb un anticòs contra FLRT3. Els immunoprecipitats i els llisats totals els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i es van analitzar per western-blot amb anticossos específics contra FLRT3 i contra Robo1 (el qual reconeix una regió intracel·lular del receptor) (**Figura 47**).

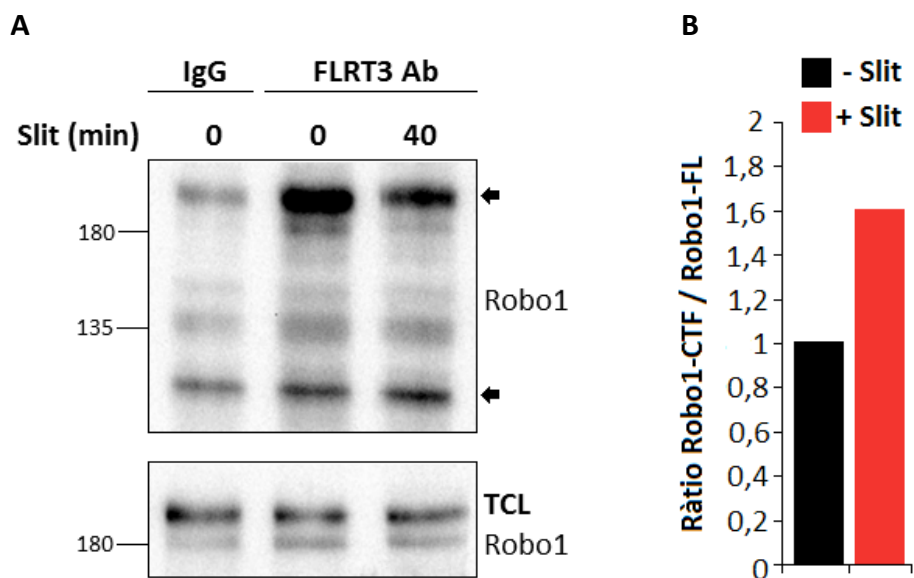


Figura 47 FLRT3 uneix al fragment Robo1-CTF generat per Slit1. A) Neurones talàmiques rostrals es van cultivar durant dos dies *in vitro* (2DIV) i es van estimular o no amb Slit1 tal i com s'indica. Es va determinar la proteïna total dels llisats d'aquests cultius mitjançant el mètode Bradford i els mateixos µg del llisat de cada condició experimental es van incubar amb l'anticòs contra FLRT3 (FLRT3 Ab) o amb IgGs de cabra (IgG) com a control. Posteriorment, aquests llisats es van immunoprecipitar utilitzant una

combinació de la resina Protein A Sepharose i Protein G Sepharose i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos específics contra Robo1 (panel superior). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Robo1 (panel inferior) per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem un increment en la quantitat de Robo1-CTF que co-immunoprecipita amb FLRT3 en la condició on s'havia estimulat amb Slit1 durant 40 minuts (carril 3, fletxa inferior, panel superior). També veiem que Robo1 en aquesta mateixa condició co-immunoprecipita menys amb FLRT3 (carril 2, fletxa superior, panel superior). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). B) Quantificació dels nivells de co-immunoprecipitació de Robo1-CTF (en A, fletxa inferior, panel superior) respecte Robo1 sencer (en A, fletxa superior, panel superior) en la condició estimulació amb Slit1 durant 40 minuts (barra vermella) i en la condició sense estimulació (barra negra), condició control que pren el valor 1. La quantificació es va realitzar en ImageJ tenint en compte els pixels de cadascuna de les bandes i els nivells a l'immunoprecipitat, es va corregir pels nivells de proteïna de partida al llisat total (panel inferior en A). A les condicions amb i sense Slit1, es va restar la senyal de les bandes de la co-immunoprecipitació control amb IgGs de cabra. La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). Dades corresponents a un únic experiment. IgG: immunoglobulines, FLRT3 Ab: anticòs contra FLRT3 (produït en cabra) i TCL: llisat total. Slit1 (0,25µg/mL).

En aquest experiment vam veure que quan estimulem les neurones talàmiques amb Slit1 durant 40 minuts la interacció entre FLRT3 i Robo1 disminueix (carril 3, panel superior, fletxa superior) (**Figura 47**) i la interacció entre FLRT3 i Robo1-CTF augmenta lleugerament (carril 3, panel superior, fletxa inferior) (**Figura 47**). En la quantificació, on la condició sense Slit1 pren el valor 1, és evident que la presència de Slit1 fa que hi hagi un gran increment en la interacció entre FLRT3 i Robo1-CTF, ja que el ràtio passa de ser 1 a ser 1,6. Aquest fet podria indicar que el fragment Robo1-CTF desplaça la interacció de FLRT3 cap a Robo1-CTF i per aquest motiu veiem una banda de Robo1 menys intensa quan hi ha Slit1 (carril 3, panel superior, fletxa superior) (**Figura 47A i 47B**). No obstant, aquesta competició de Robo1 i Robo1-CTF per FLRT3 no creiem que sigui suficient per explicar la davallada en els nivells de co-immunoprecipitació de Robo1 en la condició amb Slit1 respecte la condició sense Slit1 (carrils 3 i 2, respectivament, fletxa superior, panel superior) (**Figura 47A**) ja que l'increment de Robo1-CTF que co-immunoprecipita no és tant gran (carrils 3 i 2, respectivament, fletxa inferior, panel superior) (**Figura 47A**).

En aquest experiment vam concloure que amb presència de Slit1, fet que fa que es

generi més fragment Robo1-CTF, hi ha més quantitat de fragment que interacciona amb FLRT3 i que a més a més Robo1-CTF podria estar desplaçant la interacció de FLRT3 amb Robo1 cap a Robo1-CTF fet que indicaria que tot o gairebé tot el fragment generat s'uneix a FLRT3. Aquest resultat ens torna a indicar que FLRT3 molt probablement exerceix una regulació en la senyalització Slit/Robo1.

En quart lloc, i tot i no haver tingut resultats fiables en les cèl·lules HEK293T, vam voler estudiar si el processament que veïem del receptor Robo1 en neurones talàmiques era produït per metaloproteases ja que s'havien descrit que estaven implicades en el processament de Robo1 [331][210]. Per això vam posar en cultiu neurones del tàlem rostral durant 2DIV i les vam estimular amb PMA (forbol 12-miristat 13-acetat) durant diferents temps: 0', 30', 120' i O/N. Aquesta és una droga àmpliament utilitzada per activar l'activitat dels enzims metaloproteasa [331][335][336][337][338][339][340][341][342][343]. No es coneix bé com actua, però en algun cas s'ha observat que en presència de PMA hi ha activació de la quinasa PKC [342]. Vam utilitzar dues concentracions diferents de la droga, 0,2 μ M i 0,8 μ M, ja que en els diferents estudis on s'havia publicat la seva activitat activadora de metaloproteases utilitzaven concentracions molt dispars. D'aquesta manera podríem identificar la concentració en què és eficaç en neurones talàmiques. Després de l'estimulació amb el PMA vam recollir els llisats i vam fer una immunoprecipitació amb un anticòs contra Robo1 (el qual reconeix una regió intracel·lular del receptor). Els immunoprecipitats i els llisats totals els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i vam analitzar les mostres per western-blot amb l'anticòs específic contra Robo1 (el mateix que per la immunoprecipitació) (**Figura 48**).

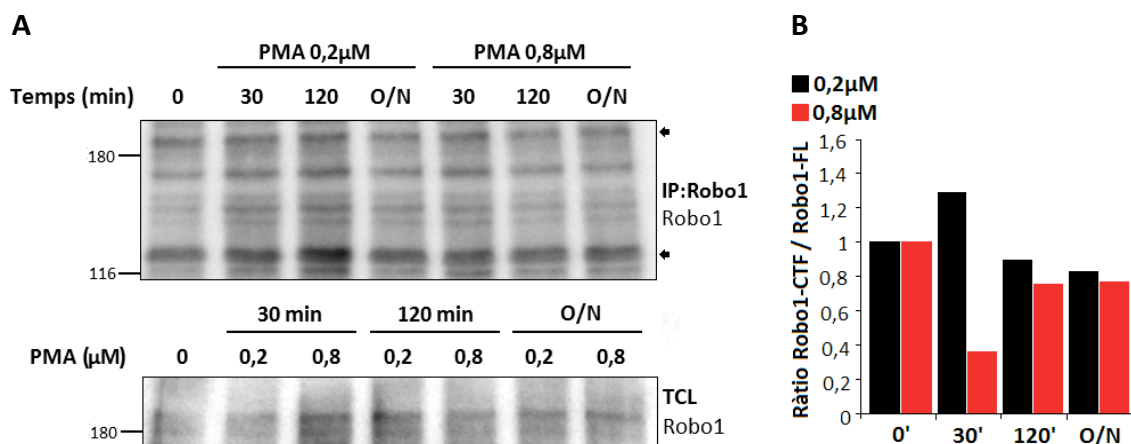


Figura 48 Robo1 és processat per metaloproteases. A) Neurones talàmiques rostrals es van cultivar durant dos dies *in vitro* (2DIV) i es van estimular amb 0,2 μ M o 0,8 μ M de PMA durant diferents temps tal i com s'indica. Es va determinar la proteïna total dels llisats d'aquests cultius mitjançant el mètode Bradford i els mateixos μ g del llisat de cada condició experimental es van incubar amb l'anticòs contra Robo1. Posteriorment, aquests llisats es van immunoprecipitar utilitzant una combinació de la resina Protein A Sepharose i Protein G Sepharose i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos específics contra Robo1 (panel superior). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Robo1 (panel inferior) per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem un increment en la generació de Robo1-CTF (carril 1-3, fletxa inferior, panel superior) que correlaciona amb l'estimulació de 0,2 μ M de PMA. La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). B) Quantificació dels nivells de co-immunoprecipitació de Robo1-CTF (en A, fletxa inferior, panel superior) respecte Robo1 sencer (en A, fletxa superior, panel superior) durant els diferents temps d'estimulació amb 0,2 μ M de PMA (barres negres) o amb 0,8 μ M de PMA (barres vermelles), sent el temps 0 minuts la condició control que pren el valor 1. La quantificació es va realitzar en ImageJ tenint en compte els pixels de cadascuna de les bandes i els nivells a l'immunoprecipitat, es va corregir pels nivells de proteïna de partida al llisat total (panel inferior en A). Veiem un increment del 30% en temps d'estimulació de 30 minuts amb 0,2 μ M de PMA. Dades corresponents a un únic experiment. IP: immunoprecipitat i TCL: llisat total.

Com podem apreciar en el western-blot de la immunoprecipitació de Robo1 en neurones talàmiques en cultiu en la condició de l'estimulació amb 0,8 μ M de PMA no veiem cap efecte en la generació del fragment Robo1-CTF (carrils 5, 6, i 7, fletxa inferior) (**Figura 48A**). En la quantificació (**Figura 48B**) tampoc s'aprecia cap efecte, tot i que el resultat del temps 30 minuts és especialment baix possiblement degut a algun problema en el processament d'aquesta la mostra. En el western-blot de la condició on es van estimular les neurones amb 0,2 μ M de PMA veiem un increment en la generació

del fragment Robo1-CTF a mesura que augmenta el temps d'estimulació, sent 120 minuts on es produeix la generació màxima (fletxa inferior, panel superior) (**Figura 48A**). Contràriament, al fer la quantificació i corregir pels nivells de Robo1 en els llisats totals aquesta apreciació canvia, és a dir, en el temps d'estimulació de 120 minuts els nivells de Robo1 (panel inferior) (**Figura 48A**) són més elevats que en el temps d'estimulació de 30 minuts (panel inferior) (**Figura 48A**), llavors l'increment de senyal de Robo1-CTF que veiem en els immunoprecipitats (fletxa inferior, panel superior) (**Figura 48A**) no és degut a l'estimulació sinó que a que hi havia més Robo1 en els llisats de partida. Per tant, en el temps 30 minuts d'estimulació amb 0,2 μ M de PMA és la única condició on veiem un increment en la generació de Robo1-CTF, concretament és un augment del 30% (**Figura 48B**). Amb aquest experiment vam poder concloure que probablement Robo1 pot ser processat per metaloproteases en les neurones talàmiques.

Tot i només tenir un experiment fet, la tendència observada sembla clara encara que per poder-ho confirmar faltaria falta repetir aquest experiment i fer-ne d'altres com per exemple, utilitzar drogues inhibidores de l'activitat metaloproteasa i veure que abolim l'efecte del PMA i/o l'efecte de l'estimulació amb Slit1. També fora interessant identificar la metaloproteasa que dur a terme el processament de Robo1 i estudiar el seu patró d'expressió durant el desenvolupament del cervell. Si hi hagués expressió al tàlem, hom podria especular sobre una possible funció, juntament amb FLRT3, en els axons talàmics *in vivo*. De fet, vam intentar inhibir la formació del fragment processat de Robo1 amb l'inhibidor de metaloproteases TAPI1 igual que havíem intentat fer en cèl·lules HEK293T, però a l'igual que passava en les cèl·lules HEK293T, en la condició on hi havia el TAPI el processament de Robo1 en comptes de disminuir augmentava considerablement (resultat no mostrat). Davant d'aquest resultat vam deixar de treballar amb aquesta droga ja que els resultats que sempre havíem obtingut amb ella eren incoherents.

Per últim, sabent que en les cèl·lules HEK293T havíem vist un increment en el processament de Robo1 amb la presència de FLRT3, vam voler estudiar si *in vivo* FLRT3 jugava algun paper en la taxa de processament del receptor. Per això, vam posar en

cultiu neurones talàmiques rostrals durant 2DIV de teixit *FLRT3*^{-/-} i de teixit control (amb expressió de FLRT3) i vam fer una immunoprecipitació utilitzant un anticòs contra Robo1 (que reconeix una regió de la part intracel·lular del receptor). Els immunoprecipitats i els llisats totals els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i els vam analitzar per western-blot amb l'anticòs específic contra Robo1 (el mateix que l'utilitzat en la immunoprecipitació). La idea era veure si en el teixit *FLRT3*^{-/-} hi havia igual, més o menys processament que en el teixit control. Per fer aquest experiment vam tenir molts problemes tècnics, primer amb l'estoc de membranes de PVDF per fer el western-blot ja que no es podia detectar correctament cap proteïna degut a un estoc de membranes en mal estat; segon hi havia problemes per obtenir embrions *FLRT3*^{-/-} ja que va ser un període on va costar d'obtenir femelles embarassades i, tercer, quan hi havia embrions cap o molt pocs eren *FLRT3*^{-/-} ja que per aquests experiments de immunoprecipitació havíem calculat que eren necessaris com a mínim 5 embrions per condició. Després vam pensar en infectar les neurones amb virus que portessin un shRNA per abolir l'expressió de FLRT3 en aquestes neurones, però no vam poder obtenir aquests shRNAs. De tal manera que finalment no tenim resposta a la qüestió de si FLRT3 té algun paper en la taxa de processament de Robo1 en neurones talàmiques.

10. FLRT3 i Robo1 intervenen en la guia axonal dels TCA rostrals

Com s'ha explicat en la introducció la topografia del tàlem està molt ben regulada per la presència de molècules guia que són reconegudes pels seus receptors específics en el con de creixement. De manera que les neurones del tàlem rostral innerven regions de l'escorça motora, mentre que les neurones del tàlem caudal innerven regions de l'escorça visual. També s'ha explicat que els axons rostrals (r)TCAs, al creuar la regió anomenada "corridor", es troben amb nivells elevats de Netrin1 i Slit1 que, com a resultat final, generen un efecte net d'atracció d'aquests axons cap a la part rostral. El grup de la Dra. Guillermina López Bendo (Instituto de Neurociencias de Alicante) havia fet una observació molt curiosa sobre el comportament dels axons rTCAs i era que responien de manera molt diferent a Slit1 i Netrin1 quan es presenten de manera

individual: en presència de Slit1, els rTCAs són repel·lits, mentre que Netrin1 no indueix cap resposta. Semblava que en aquest context la presència de Slit1 fa que els axons desencadenin una resposta d'atracció cap a Netrin1 que només es manifesta quan Netrin1 es presenta juntament amb Slit1 [223].

El grup de la Dra. López Bendito, va veure que Robo1 i Robo2 s'expressen en els rTCAs, i es va estudiar si estaven realment implicats en l'atracció cap a la font de Netrin1 en presència de Slit1, és a dir, en la combinació S+N. Es va comprovar en animals knock-out que Robo1, però no Robo2, era necessari perquè es donés aquesta atracció i consegüentment es van detectar defectes en la topografia d'aquests axons en els animals *Robo1*^{-/-}. Posteriorment, es va observar que perquè es donés l'atracció era necessari que hi hagués un increment en els nivells de DCC en la membrana del con de creixement dels rTCAs i que era aquest receptor qui desencadenava la senyalització d'atracció induïda per Netrin1 [334]. Donats els nostres resultats sobre la interacció i la regulació de Robo1 per part de FLRT3 i el fet que Robo1 era necessari per l'efecte atractiu sobre els rTCAs de la combinació S+N, vam establir una col·laboració amb la Dra. López Bendito per estudiar la possible participació de FLRT3 en la regulació d'aquesta resposta dels rTCAs en la que també va participar el grup del Dr. Rüdiger Klein (Max-Planck Institute Neurobiology, Martinsried-Munich, Alemanya).

En primer lloc, en animals knock-out per *FLRT3*, es va demostrar que FLRT3 era necessari perquè en els rTCAs es produís l'increment en els nivells de DCC a la membrana del con de creixement i, consegüentment, que fossin atrets per la combinació S+N. A més a més, també es va observar que en el teixit *FLRT3*^{-/-} els rTCAs tenien defectes en la que hauria de ser la seva projecció topogràfica correcta.

A partir d'aquí i sabent la implicació de FLRT3 en el control d'aquesta resposta de guia axonal, el nostre grup es va centrar en estudiar els mecanismes moleculars que hi havien darrere d'aquesta resposta, sobretot aquells relacionats amb FLRT3 i la seva interacció amb Robo1. Principalment, vam estudiar possibles vies de senyalització implicades i la relació entre FLRT3 i Robo1 i les altres molècules que intervenen en aquesta resposta d'atracció: Netrin i DCC. També vàrem estudiar la relació entre

Robo1 i DCC.

11. Senyalització en els TCA rostrals

Sabiem que la resposta d'atracció a la combinació de Slit1 i Netrin1, S+N, requeria un increment de receptors DCC a la membrana, un efecte que depenia de l'activitat de Robo1 i FLRT3. Així, vam utilitzar aquest increment de DCC com a paràmetre mesurable per tal d'estudiar les vies de senyalització que estaven implicades en la resposta d'atracció. L'aproximació va ser pretractar cultius de neurones talàmiques amb diversos inhibidors farmacològics de proteïnes clau de diferents vies de senyalització i estimular-les posteriorment amb la combinació S+N. Els inhibidors utilitzats van ser UO126, que actua sobre MEK1/2 (via MAPKs) [344], i en algun estudi la via MAPK s'ha associat a transport de receptors [345][346][347]; LY294002, que actua sobre PI3K [344], ja que s'havia descrit en neurones corticals que l'activació de PI3K era necessària perquè es produís una despolarització de la membrana i això produïa un increment en els nivells de DCC en la membrana d'aquestes neurones [348]; Y27632, que actua sobre ROCK [344], i s'havia descrit que la inactivació d'aquesta quinasa promovia un increment en els nivells de DCC a membrana en neurones comissurals espinals [197]; SQ22536 que inhibeix l'adenilat ciclase i també FSK com activador d'aquest mateix enzim. Vam utilitzar un inhibidor i un activador de l'adenilat ciclase perquè en diversos estudis s'havia descrit que l'activitat d'aquesta via induïa un increment en els nivells de DCC a la membrana [163][165][197]. Finalment, també vam utilitzar la ciclohexamida, que actua sobre el procés de traducció [349], i així sabríem si el procés pel qual incrementa el DCC a membrana és degut simplement a que hi ha més traducció del mRNA d'aquest receptor. Després de l'estimulació amb S+N les neurones es van fixar i es va realitzar una doble immunofluorescència per comprovar els nivells de DCC a la membrana i els nivells totals de receptor. En la doble immunofluorescència, les neurones sense permeabilitzar es van incubar primer un anticòs primari contra DCC que reconeix una regió de la part extracel·lular del receptor seguit d'un anticòs secundari específic conjugat a un fluorocrom. Després dels rentats es va procedir a la permeabilització de les neurones i es va tornar a incubar amb el

mateix anticòs contra DCC seguit d'un anticòs secundari específic que estava unit a un fluorocrom diferent. El raonament d'aquesta doble immunofluorescència era que amb la primera incubació marcàvem només el DCC de membrana amb un color determinat i amb la segona incubació marcàvem el DCC total de la neurona amb un altre color. Les imatges obtingudes per confocal de les dues senyals es van quantificar per cada con de creixement i vàrem poder obtenir així el ràtio DCC de membrana (DCCmem) respecte el DCC total per veure quina de les drogues utilitzades afectava a l'increment de DCC en la membrana induïda per S+N. Els inhibidors que aconseguissin afectar aquest increment ens donarien una pista sobre les vies de senyalització implicades (**Figura 49**).

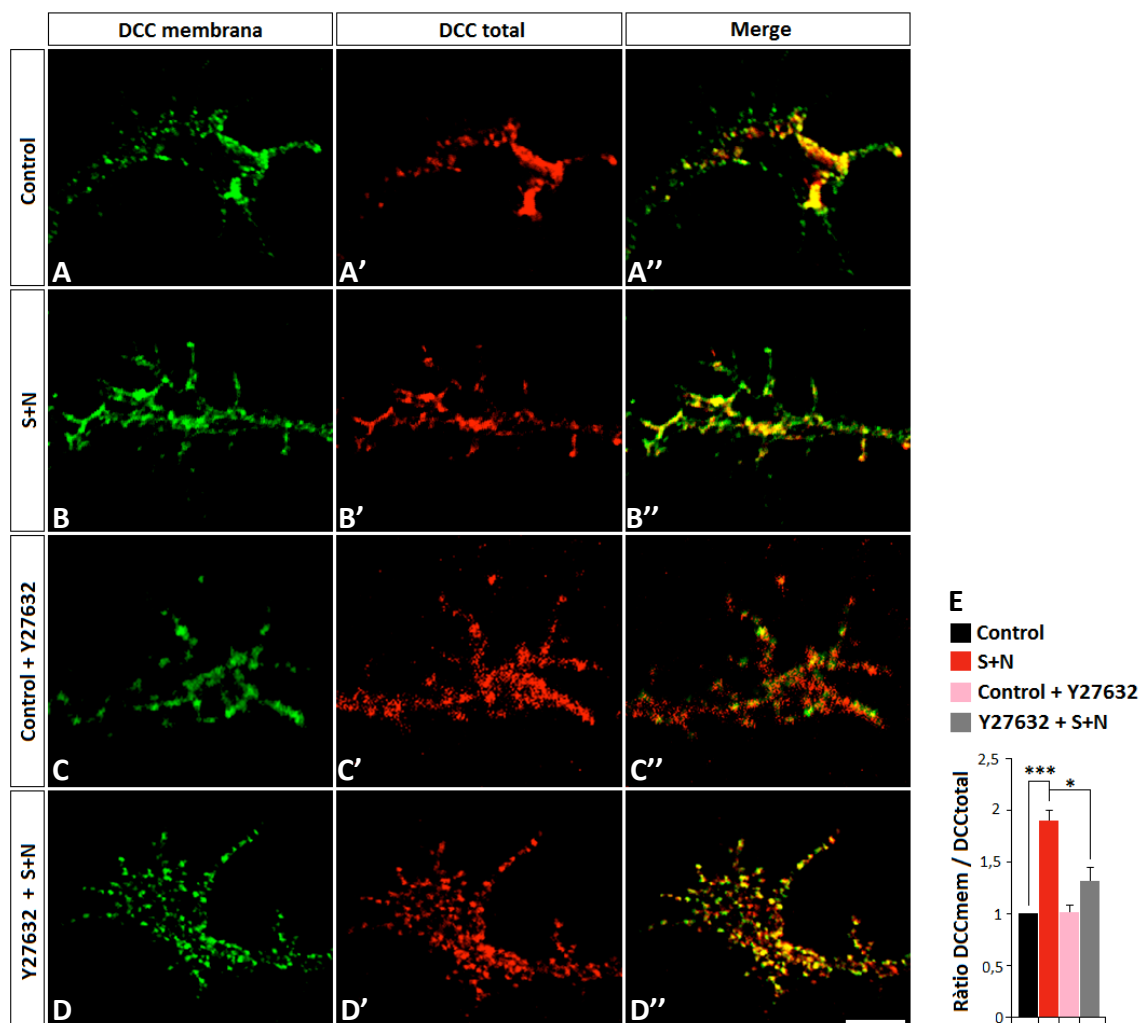


Figura 49 La via ROCK està implicada en la resposta d'atracció. A-D'') Neurones talàmiques rostrals en cultiu durant 2DIV es van tractar amb els diversos inhibidors, posteriorment es van estimular o no amb S+N tal i com s'indica i van ser processades per doble immunofluorescència. A, B, C i D) Marcatge del DCC de membrana. A', B', C' i D') Marcatge del DCC total. A'', B'', C'' i D'') Combinació ("merge") de les

imatges A, B, C i D amb A', B', C' i D', respectivament, on veiem en groc al DCC localitzat en la membrana. E) Quantificació del nombre de píxels verds (DCC de membrana) respecte els píxels vermells (DCC total) en les condicions indicades (barra negra, control, que pren el valor 1; barra vermella, control més S+N; barra rosa, control més inhibidor de ROCK; barra gris, inhibidor de ROCK més S+N). El pretractament de les neurones amb l'inhibidor de ROCK, Y27632, evita l'increment de DCC en la membrana. Dades presentades com la mitjana + SEM de tres experiments, en cada condició es van recomptar 15-20 cons de creixement i de cadascun es van recomptar 4 plans de confocal. Comparació de mitjanes, * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$, t-student. Escala 10 μ m. S+N: Slit i Netrin i Y27632: inhibidor de ROCK. Slit1 (0,25 μ g/mL) i Netrin1 (0,5 μ g/mL).

Tal i com podem veure en la **Figura 49B** en la condició S+N (**Figura 49B-B''**) vam observar un gran augment del valor del ràtio DCCmem/DCCtotal amb un increment de 1,9 respecte el control (**Figura 49A-A''**), demostrant que aquest mètode de quantificació és fiable i ens dona una bona finestra d'inducció per estudiar els possibles efectes de les drogues que volíem testar. De tots aquests inhibidors, només la droga Y27632, que inhibeix l'activitat de la quinasa ROCK, va bloquejar l'increment de DCC a la membrana després de l'estimulació amb Slit i Netrin (S+N). Com podem veure en la **Figura 49D''** en la condició on utilitzem aquest inhibidor hi ha bastants punts vermells que corresponen al DCC que no es troba en la membrana, observació que suggereix que en aquestes condicions DCC no s'ha mobilitzat cap a la membrana. La quantificació feta d'aquests experiments, confirma aquesta observació on veiem que l'aplicació de la droga Y27632 abans de l'estimulació amb S+N baixa el ràtio de 1,9 gairebé fins a 1, $p < 0,05$ (**Figura 49B**). L'inhibidor Y27632 no té cap efecte sobre la localització basal de DCC tal i com es mostra en la Figura 41B (Y27632 control respecte el control sense droga) indicant que aquest inhibidor no influeix per sí mateix sobre la localització de DCC, sinó que actua específicament sobre l'augment de DCCmem induït per S+N. Per tant, aquests resultats indiquen que la via de senyalització on ROCK intervé té un paper fonamental en la resposta d'atracció dels axons talàmics rostrals en presència de Slit i Netrin. Aquest resultat va ser sorprenent ja que hi ha innumerables exemples on s'atribueix a ROCK respostes de repulsió [350][351][192][352], mentre que gairebé cap li atribueix respostes de creixement [353]. Tot i així, vam voler continuar estudiant la via implicada en la nostra resposta d'atracció i com ROCK hi estava implicat.

A continuació vam voler estudiar quins efectors de ROCK estaven implicats en la senyalització d'atracció induïda per Slit+Netrin. Es coneix que ROCK regula l'activitat de dues proteïnes que tenen relació directa amb el procés de despolimerització i el flux retrògrad d'actina, aquestes són la cofilina i la miosina (MLC), respectivament (**Figura 14**). L'activació de ROCK per Rho (A,B,C) fa que fosforili i activi a LIMK qui al seu torn fosforila i inactiva a cofilina, que és un efector de la despolimerització d'actina en els extrems -. D'altra banda l'activació de ROCK pot fer que fosforili i activi directament a MLC, que controla el flux retrògrad, o que fosforili i inactivi a la MLC Fosfatasa qui hauria de desfosforilar a MLC i inactivar-la [188]. Per tant, ROCK actua inactivant a cofilina, evitant així la despolimerització de l'extrem – i estabilitzant els filaments d'actina, i activant a MLC, contraent així els filaments d'actina (**Figura 14**) [188]. Per tal d'estudiar si el tractament amb S+N finalment tenia algun efecte sobre la funció d'aquestes dues proteïnes, cofilina i MLC, es van posar neurones talàmiques rostrals en cultiu durant 2DIV i es van estimular amb S+N durant diversos temps per estudiar la corba de fosforilació: 0', 1', 5', 10' i 20'. Posteriorment es van recollir els llisats totals i es van resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i anàlisi per western-blot amb anticossos específics contra les formes fosforilades de cofilina, de MLC; els controls de càrrega es van fer amb anticossos contra cofilina total. Vam repetir l'experiment diversos cops, però els resultats obtinguts per p-cofilina van ser molt dispersos com per poder concloure res i per p-MLC no vam tenir cap resultat perquè l'anticòs no va funcionar a les nostres mans. Es a dir, no vam poder identificar si cofilina i/o MLC eren els efectors de ROCK en el nostre model d'estudi.

12. Relació entre FLRT3 – Robo1 – DCC – Netrin

Paral·lelament a l'estudi de les vies de senyalització implicades en la resposta d'atracció vista en els axons del tàlem rostral amb la presència de Slit i Netrin vam voler caracteritzar la relació FLRT3, Robo1 i DCC a nivell de la membrana plasmàtica donat que i) havíem vist que FLRT3 i Robo1 interaccionen, ii) que DCC i Robo1 també poden interaccionar [219] i iii) FLRT3 està relacionat en certa manera amb la senyalització de Netrin per mitjà de la seva interacció física i funcional amb el receptor

Unc5B [147][139][143].

En primer lloc vam voler estudiar si FLRT3 era capaç d'unir Netrin1 directament i també si podia interaccionar amb DCC. Per estudiar la unió a Netrin1 vam generar una construcció on el cDNA de Netrin1 es va fusionar per la part 3 prima amb la seqüència de l'enzim fosfatasa alcalina (AP). Quan s'expressa aquesta seqüència es genera una proteïna de fusió, Netrin1-AP, on l'activitat AP es pot detectar amb un substrat colorimètric, FASTTM FAST RED/NAPHTHOL, que genera un precipitat de color grana fàcilment detectable a nivell de microscopia òptica o amb una lupa. La proteïna de fusió Netrin1-AP i el seu control, una forma secretable de l'AP sola (SEAP), es van obtenir a partir del medi de cultiu condicionat de cèl·lules HEK293T transfectades amb aquestes construccions. Per testar la unió de Netrin1 a FLRT3, es van transfectar cèl·lules HEK293T amb els següents plàsmids d'expressió:

Exp.: pcDNA3 (control negatiu)

pcDNA3-Unc5B-C-FLAG (control positiu)

pcDNA3-FLRT3-N-Myc

Llavors es van incubar aquestes cèl·lules amb el medi condicionat enriquit amb Netrin1-AP o SEAP per facilitar la unió i, després de rentar-les, es van incubar amb el substrat FASTTM FAST RED/NAPHTHOL per evidenciar la unió de Netrin1-AP (**Figura 50**).

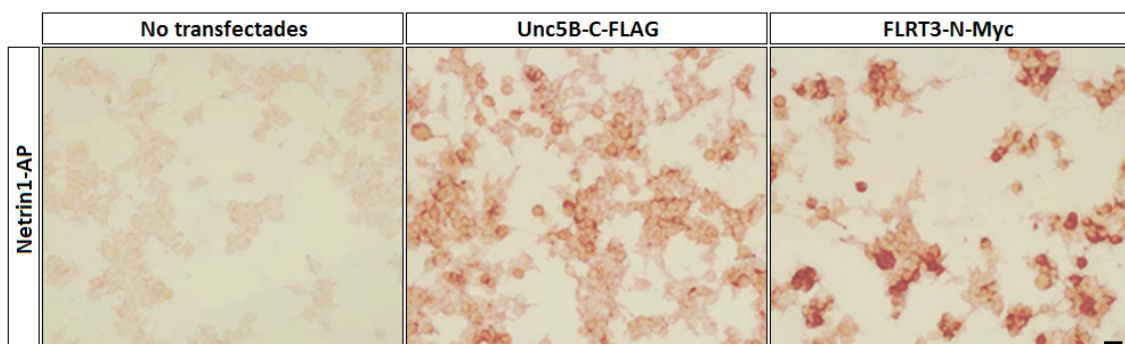


Figura 50 Netrin1-AP s'uneix a cèl·lules HEK293T transfectades amb FLRT3-N-Myc. Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb vector buit (control negatiu), Unc5B^{C-FLAG} (control positiu) o FLRT3^{N-Myc} tal i com s'indica. Aquestes cèl·lules es van incubar amb medi condicionat enriquit en Netrin1-AP i posteriorment amb el substrat de l'AP, FASTTM FAST RED/NAPHTHOL. Veiem com en el control positiu es diposita el

precipitat de color grana i també sobre les cèl·lules transfectades amb FLRT3. Escala 20µm.

En tots el experiment realitzats es va obtenir el precipitat grana a sobre les cèl·lules transfectades amb Unc5B, el control positiu. Les dues primeres vegades que vam fer aquest experiment vam detectar unió de Netrin-AP a cèl·lules sobreexpressores de FLRT3 (**Figura 50**). El resultat era prou novedós i important com per assegurar-nos que el que observàvem era realment específic. Llavors ens vam adonar que la construcció de FLRT3 que havíem utilitzat per transfectar les cèl·lules tenia l'etiqueta Myc en la part extracel·lular de la proteïna i que això podria estar interferint en el resultat que havíem obtingut, potser Netrin1-AP no s'estava unint a FLRT3 sinó que s'unia a Myc o potser amb aquesta construcció, FLRT3-N-Myc, FLRT3 no es plegava correctament i es formava una regió on Netrin1-AP podia unir-se. Així, vam repetir el mateix experiment utilitzant una construcció de FLRT3 que tenia l'etiqueta FLAG en la part intracel·lular i per tant, una part extracel·lular intacta (**Figura 51**). Aquesta construcció l'hem utilitzat moltes vegades i sabem que la proteïna es localitza correctament a la membrana.

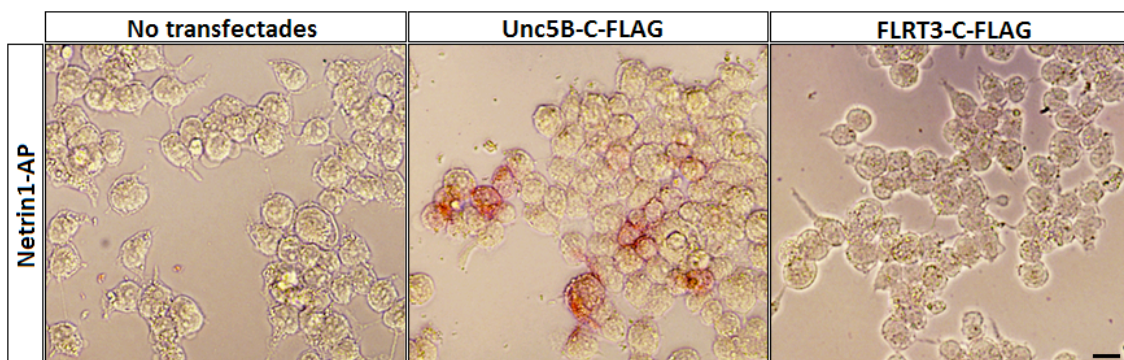


Figura 51 Netrin1-AP no s'uneix a cèl·lules HEK293T transfectades amb FLRT3-C-FLAG. Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb vector buit (control negatiu), Unc5B^{C-FLAG} (control positiu) o FLRT3^{C-FLAG} tal i com s'indica. Aquestes cèl·lules es van incubar amb medi condicionat enriquit en Netrin1-AP i posteriorment amb el substrat de l'AP, FASTTM FAST RED/NAPHTHOL. Veiem com en el control positiu es diposita el precipitat de color grana, però no sobre les cèl·lules transfectades amb la construcció on FLRT3 porta l'etiqueta FLAG a la part intracel·lular (C-terminal). Escala 10µm.

Els resultats obtinguts per aquest experiment, el qual vam repetir dues vegades, van ser el contrari del que havíem tingut abans, és a dir, que FLRT3 no unia a Netrin1 (**Figura 51**). Donat aquesta controvèrsia en els resultats vam voler tornar a provar si FLRT3 unia a Netrin1 mitjançant altres aproximacions. Primer vam fer una

immunoprecipitació amb la resina anti-FLAG en cèl·lules HEK293T sense transfectar (control negatiu) o bé transfectades amb FLRT3-C-FLAG o amb Unc5B-C-FLAG (control positiu) i estimulades amb un medi on havíem produït Netrin1. Aquesta aproximació no va funcionar ja que en el control positiu no vam detectar mai Netrin1 en els immunoprecipitats. Això podria ser degut a diverses possibilitats, a que vam perdre la interacció Netrin1-AP-Unc5B pel tampó de lisis utilitzat (tot i que era el mateix que en altres experiments d'immunoprecipitació que havíem fet en cèl·lules HEK293T) a que quan Netrin1 es va unir a Unc5B aquest es va processar i per això no vam poder detectar a Netrin1 en els immunoprecipitats o, finalment, a que la quantitat de Netrin1 del medi condicionat no fos suficient com per poder-la detectar en el wester-blot dels immunoprecipitats. En segon lloc vam realitzar un assaig de co-localització per immunofluorescència per detectar la unió Netrin1-FLRT3. En aquest cas, vam estimular cèl·lules HEK293T no transfectades o bé transfectades amb FLRT3-C-FLAG o amb Unc5B-C-FLAG, amb una proteïna recombinant comercial de Netrin1 fusionada amb una cua d'histidines (6xHis). En aquest experiment el marcatge amb anticossos contra His en la condició on les cèl·lules no estaven transfectades era de molta més intensitat que en el control positiu, així que amb aquesta aproximació tampoc vam poder concloure res sobre la possible unió de Netrin1 amb FLRT3. Per últim, vam fer uns experiments directament amb la proteïna recombinant, totalment *in vitro*, en què vam incubar 1µg de proteïna recombinant FLRT3^{ECD}-Fc o Unc5B^{ECD}-Fc amb 1µg de proteïna recombinant Netrin1 (fusionada amb cua His). Els complexos es van precipitar amb una resina de níquel, que uneix les histidines, i vam determinar la presència de Unc5B i FLRT3 en els precipitats per western-blot amb anticossos contra Fc. En aquest cas en els controls negatiu, FLRT3^{ECD}-Fc i Unc5B^{ECD}-Fc sols, sense Netrin1, vam detectar aquestes proteïnes recombinants en els precipitats, suggerint l'existència d'una unió inespecífica amb la resina de níquel, invalidant així el resultat de l'experiment (resultat no mostrat).

Finalment no vam poder establir si Netrin1 s'uneix a FLRT3 degut a la controvèrsia en els resultats obtinguts i als problemes experimentals patits al fer les diferents aproximacions.

Per una altra banda, ens va interessar estudiar la possible interacció entre FLRT3 i DCC i com l'estimulació amb S+N la podria estar modulant. Per això, vam transfectar cèl·lules HEK293T amb els següents plàsmids d'expressió:

Exp.: pcDNA3-DCC^{C-HA} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3-DCC^{C-HA} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

Posteriorment, vam estimular les cèl·lules amb Netrin1 o la combinació S+N per veure si la presència d'aquestes molècules de guia axonal modulava la interacció entre DCC i FLRT3, el què ens aportaria informació sobre el mecanisme que hi ha darrera de la resposta que estàvem estudiant. Després de l'estimulació es va fer una immunoprecipitació, els immunoprecipitats i els llisats totals els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i es van analitzar per western-blot amb anticossos específics contra DCC i contra FLAG (FLRT3) (**Figura 52**).

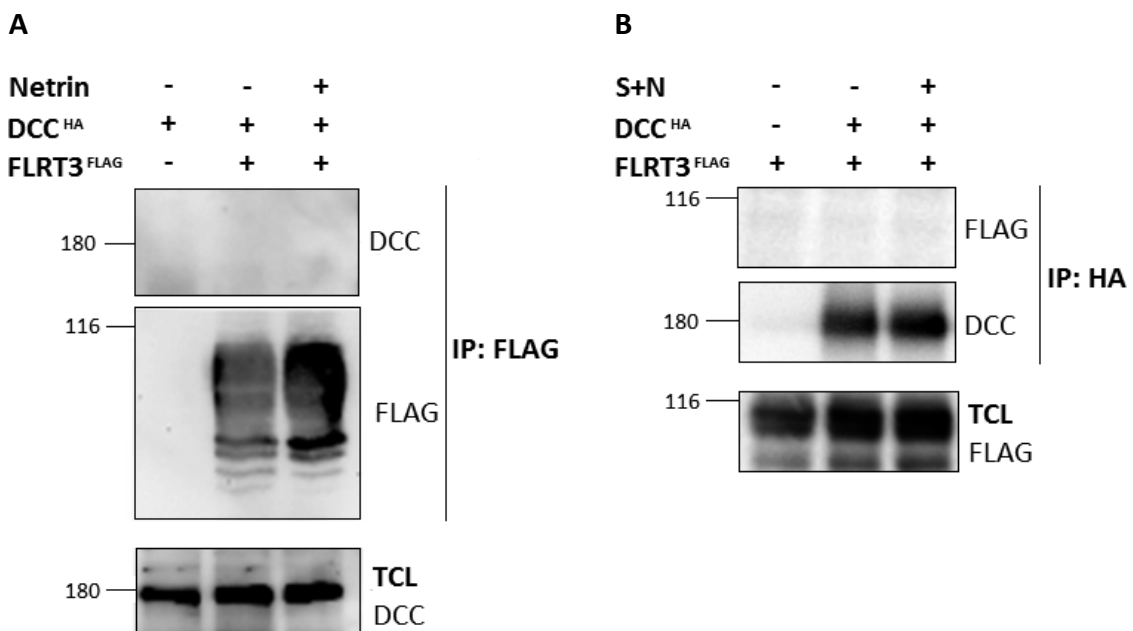


Figura 52 FLRT3 no interacciona amb DCC. A) Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb FLRT3^{FLAG} i/o DCC^{HA} i es van estimular o no amb Netrin1 tal i com s'indica. Llisats d'aquestes cèl·lules es van immunoprecipitar amb la resina anti-FLAG (FLRT3) i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos contra DCC (panel superior) i FLAG (FLRT3, panel central). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra DCC per comprovar que els nivells de DCC de partida

eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem que DCC no co-immunoprecipita amb FLRT3 ni en condicions basals (carril 2, panel superior) ni després de l'estimulació amb Netrin1 (carril 3, panel superior). B) Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb DCC^{HA} i/o FLRT3^{FLAG} i es van estimular o no amb Slit1+Netrin1 tal i com s'indica. Llisats d'aquestes cèl·lules es van immunoprecipitar amb la resina anti-HA (DCC) i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos contra FLAG (FLRT3, panel superior) i DCC (panel central). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra FLAG (FLRT3) per comprovar que els nivells de FLRT3 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem que DCC no co-immunoprecipita amb FLRT3 ni en condicions basals (carril 2) ni en presència de Slit1+Netrin1 (carril 3). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). IP: immunoprecipitat, TCL: llisat total i S+N: Slit1 + Netrin1. Slit1 (0,25µg/mL) i Netrin1 (0,5µg/mL).

En un primer experiment (**Figura 52A**) vam immunoprecipitar FLRT3 amb la resina anti-FLAG i vam estudiar si DCC co-immunoprecipitava. Com podem veure en la **Figura 52A** no vam detectar DCC en els immunoprecipitats de FLRT3 ni en condicions basals (carril 2, panel superior) ni tampoc en cèl·lules estimulades amb Netrin1 (carril 3, panel superior), tot i haver una expressió significativa de DCC en els llisats originals (carril 2 i 3, panel inferior). En tots aquests experiments vam haver-hi una condició on vam transfectar Robo1-C-Myc + FLRT3-C-FLAG com a control positiu de co-immunoprecipitació amb FLRT3 i en tots ells aquest control va funcionar correctament. Aquests resultats demostren que FLRT3 no interacciona amb DCC i per tant, no intervé directament en la senyalització d'aquest receptor.

No obstant, i donat que en el nostre model d'estudi és la combinació de Slit1 i Netrin1 (S+N) la que indueix l'efecte d'atracció, vam voler repetir l'experiment anterior, però estimulant les cèl·lules amb S+N (**Figura 52B**). En aquest cas vam immunoprecipitar DCC utilitzant la resina anti-HA i vam estudiar si FLRT3 co-immunoprecipitava. Com podem veure en la **Figura 52B** tampoc vam ser capaços de detectar FLRT3 en els immunoprecipitats de DCC ni en condicions basals (carril 2, panel superior), ni tampoc quan estimulem les cèl·lules amb la combinació S+N (carril 3, panel superior), tot i haver una expressió significativa de FLRT3 en els llisats originals (carril 2 i 3, panel inferior). Tot i haver obtingut aquests resultats negatius en cèl·lules HEK293T vam voler comprovar si la interacció podria donar-se en teixit nerviós suposant que la interacció DCC i FLRT3 requeria un tercer element no present en HEK293T, però sí en

neurones. Per això vam posar en cultiu durant 2DIV neurones talàmiques rostrals i vam fer una immunoprecipitació utilitzant un anticòs contra FLRT3. Els immunoprecipitats i els llisats totals els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i es van analitzar per western-blot amb un anticòs específic contra DCC (**Figura 53**).

En aquest experiment vam obtenir el mateix resultat que havíem vist en les cèl·lules HEK293T, que FLRT3 no interacciona amb DCC tampoc en neurones talàmiques, ni en condicions basals (carril 1, panel superior) ni tampoc quan s'estimula amb Netrin1 (carril 2, panel superior) (**Figura 53**).

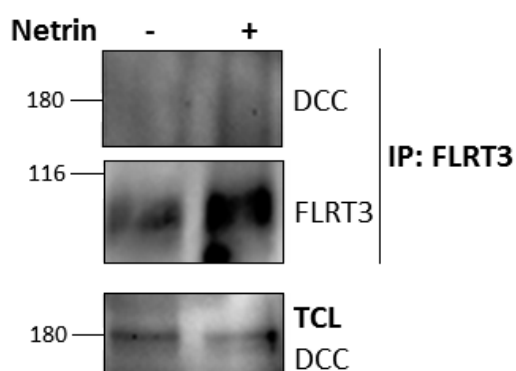


Figura 53 FLRT3 no interacciona amb DCC en el tàlem rostral. Neurones talàmiques rostrals es van cultivar durant dos dies *in vitro* (2DIV) i es van estimular amb Netrin1 tal i com s'indica. Es va determinar la proteïna total dels llisats d'aquests cultius mitjançant el mètode Bradford i els mateixos μg del llisat de cada condició experimental es van incubar amb l'anticòs contra FLRT3. Posteriorment, aquests llisats es van immunoprecipitar utilitzant una combinació de la resina Protein A Sepharose i Protein G Sepharose i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticòs específics contra DCC (panel superior) i FLRT3 (panel central). Extractes del llisat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticòs contra DCC (panel inferior) per comprovar que els nivells de DCC de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem que DCC no co-immunoprecipita amb FLRT3 ni en condicions basals (carril 1, panel superior) ni després de l'estimulació amb Netrin (carril 2, panel superior). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). IP: immunoprecipitat i TCL: llisat total. Netrin1 (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Com a conclusió d'aquests experiments podem extreure que FLRT3 no interacciona amb DCC i que si intervé en el control de la senyalització de Netrin-DCC ho fa de forma indirecta.

En segon lloc, vam voler estudiar la relació entre Robo1 i DCC ja que s'ha descrit que

Robo1 pot interaccionar directament amb el domini P3 de DCC per mitjà del seu domini CC1, un mecanisme pel qual Robo1 pot silenciar l'efecte atractiu induït per Netrin1 a través de DCC [219]. Aquest mecanisme explica perquè els axons comissurals en la medulla espinal naveguen en primer cap al "floor plate" i, un cop han creuat la línia mitja, projecten contralateralment. Es sap que al "floor plate" hi ha expressió de Netrin i de Slit, i que els axons comissurals són atrets cap a aquella regió perquè expressen DCC i gairebé no Robo en la membrana, tot i que hi ha mRNA de Robo1 en el interior d'aquestes neurones. Després de creuar la línia mitja, l'efecte atractiu generat per DCC en resposta a Netrin queda silenciat per la interacció de Robo1 amb DCC. En aquest moment, Slit actua com a repulsiu per mitjà de Robo i així evita que els axons comissurals tornin a creuar la línia mitja [219]. Per comprovar si podíem reproduir aquesta interacció, vam transfectar cèl·lules HEK293T amb els següents plàsmids d'expressió:

Exp.: pcDNA3-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3-DCC^{C-HA}

També vam estimular les cèl·lules amb Slit1 i Netrin1 ja que en aquest estudi detectaven la interacció només en presència de Slit1, és a dir, en les condicions Slit1 i S+N [219]. Posteriorment vam fer una immunoprecipitació, els immunoprecipitats i els llsats totals els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i es van analitzar per western-blot amb anticossos específics contra Myc (Robo1) i contra DCC (**Figura 54**).

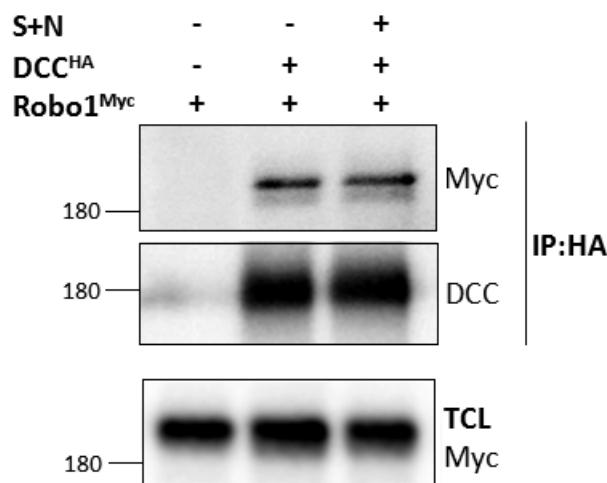


Figura 54 DCC i Robo1 interaccionen en cèl·lules HEK293T. Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb DCC^{HA} i/o Robo1-C-Myc i es van estimular o no amb Slit1+Netrin1 tal i com s'indica. Llisats d'aquestes cèl·lules es van immunoprecipitar amb la resina anti-HA (DCC) i els complexes es van analitzar per western-blot amb anticossos contra Myc (Robo1, panel superior) i DCC (panel central). Extractes del llistat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Myc (Robo1) per comprovar que els nivells de Robo1 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem que Robo1 co-immunoprecipita amb DCC tant en condicions basals (carril 2, panel superior) com després de l'estimulació amb Slit1+Netrin1 (carril 3, panel superior). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). IP: immunoprecipitat, TCL: llistat total i S+N: Slit + Netrin. Slit1 (0,25µg/mL) i Netrin1 (0,5µg/mL).

Tal i com està publicat en [219], nosaltres també veiem co-immunoprecipitació de Robo1 amb DCC quan estimulem les cèl·lules amb Slit1 i Netrin1 (carril 3, panel superior) (**Figura 54**). Sorprenentment, també veiem co-immunoprecipitació de Robo1 amb DCC en condicions basals (carril 2, panel superior) (**Figura 54**), resultat contrari al que s'havia publicat. No sabem el motiu d'aquesta discrepància, però és possible que sigui el tipus cel·lular ja que nosaltres vam utilitzar cèl·lules HEK293T, mentre que a l'article original es van utilitzar cèl·lules COS [219].

Seguidament vam voler estudiar si la presència de FLRT3 era capaç de trencar la interacció DCC-Robo1. Sabíem que FLRT3 era necessari per induir un increment en els nivells de DCC en membrana per generar una resposta atractiva en els rTCAs exposats a Slit i Netrin, però a part d'aquest efecte, vam pensar que a través de la unió amb Robo1, FLRT3 podria alliberar DCC de la inhibició de Robo1 fent més efectiva la senyalització per DCC. És a dir, que FLRT3 podria estar competint amb DCC per la unió

amb Robo1. Per això, vam transfectar les cèl·lules HEK293T amb els següents plàsmids d'expressió:

Exp.: pcDNA3-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3 (control vector buit)

pcDNA3-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3-DCC^{C-HA}

pcDNA3-Robo1^{C-Myc} + pcDNA3-DCC^{C-HA} + pcDNA3-FLRT3^{C-FLAG}

I posteriorment vam fer una immunoprecipitació, els llisats totals els vam resoldre mitjançant electroforesi SDS-PAGE i van ser anilitzats per western-blot amb anticossos específics contra Myc (Robo1), contra FLAG (FLRT3) i contra DCC (**Figura 55**).

Sorprenentment, el resultat d'aquest experiment va ser que la co-expressió de FLRT3 amb DCC i Robo1 trenca la interacció entre ambdós receptors (carril 3, panel superior) (**Figura 55**). Com es pot veure en el carril 2 (panel superior), sense FLRT3, DCC i Robo1 interaccionen com ja havíem vist en la **Figura 54**, mentre que quan s'afegeix FLRT3 es veu com aquesta interacció disminueix gairebé fins a perdre's (carril 3, panel superior) (**Figura 55**). Com veïem en la **Figura 52**, FLRT3 no interacciona amb DCC, tampoc amb presència de Robo1.

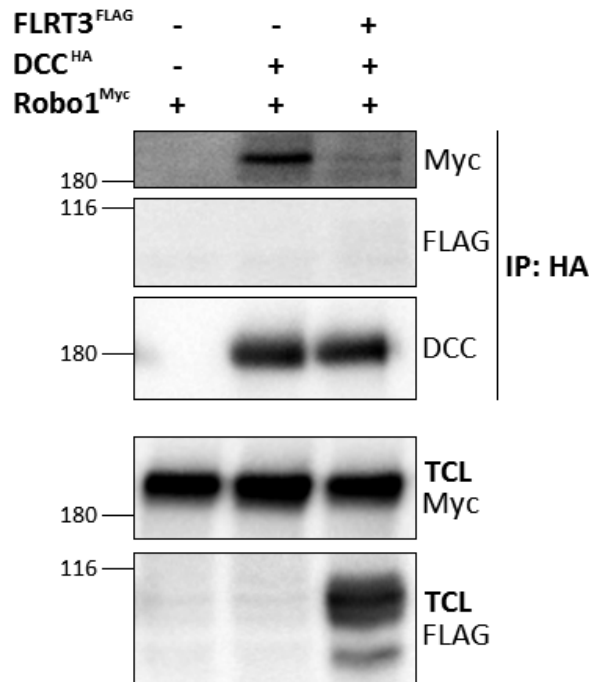


Figura 55 FLRT3 trenca la interacció entre Robo1 i DCC. Cèl·lules HEK293T es van transfectar amb

Robo1-C-Myc, DCC^{HA} i FLRT3^{FLAG} tal i com s'indica. Llisats d'aquestes cèl·lules es van immunoprecipitar amb la resina anti-HA (DCC) i els complexos es van analitzar per western-blot amb anticossos contra Myc (Robo1, panel superior), FLAG (FLRT3, panel central) i DCC (tercer panel). Extractes del llistat total (TCL) es van analitzar en paral·lel amb anticossos contra Myc (Robo1) i FLAG (FLRT3) per comprovar que els nivells de Robo1 i FLRT3 de partida eren similars en totes les condicions experimentals. Veiem que la coexpressió de FLRT3 fa que es perdi la interacció entre DCC i Robo1 (carril 3, panel superior). La posició dels pesos moleculars s'indiquen a l'esquerra de cada blot (en kDa). IP: immunoprecipitat i TCL: llistat total.

Amb aquest experiment sembla clar que FLRT3 trenca la interacció entre Robo1 i DCC i que per tant, aquest mecanisme podria estar implicat en l'atracció dels rTCA cap a la combinació Slit + Netrin: FLRT3 segregaria Robo1 per deixar més DCC actiu. No obstant, s'hauria de comprovar aquest resultat en cultius primaris de tàlem rostral.

El model que plantejarem és que d'una banda FLRT3 interacciona amb Robo1, tant amb el receptor sencer com amb el fragment intracel·lular, al donar-se aquesta interacció la senyalització canònica de repulsió Slit/Robo1 es veu bloquejada i també es veu inhibida la interacció de Robo1 amb DCC, fet que deixaria lliure a DCC i podria senyalitzar la resposta d'atracció cap a Netrin en els axons rostrals (**Figura 56**).

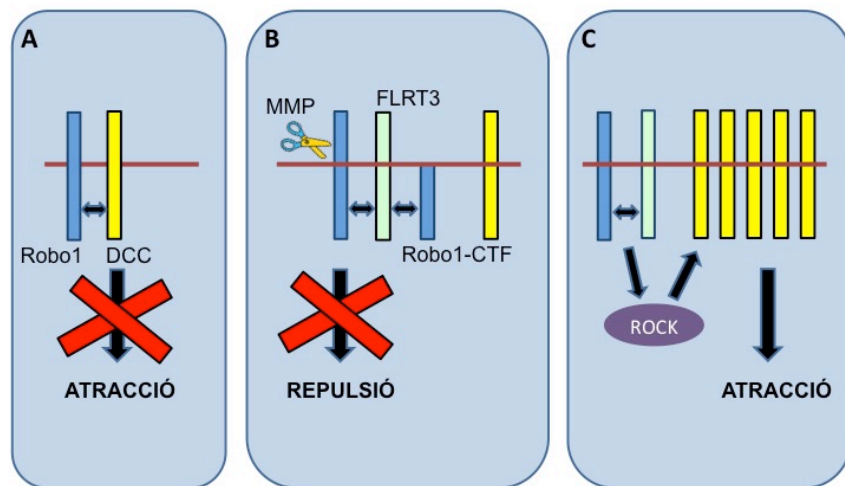


Figura 56 Esquema representatiu de la nostra hipòtesi. A) Els TCAs intermedis, que no expressen FLRT3, no desencadenen la resposta d'atracció a la combinació Slit1+Netrin1 (S+N). Hipotetitzem en aquest context que Robo1 estaria silenciant DCC mitjançant la seva interacció amb el receptor i així evitaria que en presència de S+N es desencadenés la resposta d'atracció. D'altra banda, en aquest mateix context, sabem que Robo1 pot senyalitzar la resposta de repulsió canònica en presència de Slit1. B) Els TCAs intermedis, que no expressen FLRT3, responen a Slit per mitjà de Robo1 i de Robo2. En altres contextos

biològics s'ha descrit que la resposta de repulsió duta a terme per Robo1 en presència de Slit d'una banda provoca el processament del receptor per metaloproteases i d'altra banda es produeix activació de Rac. En l'estudi en què col·laborat hem vist que en els TCAs rostrals, que sí expressen FLRT3, aquesta resposta de repulsió ve generada per Robo2 i no per Robo1. No obstant, hem observat que la presència de Slit promou el processament de Robo1 per metaloproteases en els TCAs rostrals. També hem observat que FLRT3 interacciona amb Robo1, tant amb el receptor sencer com amb el receptor processat per metaloproteases (MMP), Robo1-CTF. Per això hipotetitzem que en els axons talàmics rostrals FLRT3 d'una banda estaria bloquejant l'activació de Rac i per tant, la resposta de repulsió generada per Robo1, mitjançant la interacció amb Robo1 i amb Robo1-CTF; Robo2 no interacciona amb FLRT3 i és capaç de senyalitzar la resposta de repulsió en presència de Slit en els TCAs rostrals. I d'altra banda, a l'interaccionar amb Robo1, FLRT3 alliberaria a DCC. C) Al quedar DCC lliure, els TCAs rostrals són capaços de desencadenar la resposta d'atracció a la combinació S+N. Resposta que perquè es generi és necessària l'activació de ROCK que promou un increment en els nivells de DCC a la membrana del con de creixement.

DISCUSSIÓ

En aquesta tesi hem utilitzat diverses metodologies que engloben des de treball en llevats (doble híbrid) i en línies cel·lulars (assajos de co-immunoprecipitació, d'immunofluorescència, de biotinització i d'unió amb fosfatasa alcalina) a cultius primaris (assajos de co-immunoprecipitació i d'immunofluorescència) que ens han permès contribuir a l'establiment d'un model per la guia axonal dels axons talamocorticals. Concretament, hem trobat que FLRT3 mitjançant la interacció amb Robo1 i l'activació de les molècules de senyalització ROCK i PKA controla la guia dels axons talamocorticals rostrals perquè presentin l'ordre topogràfic adequat. Hem vist que la interacció entre FLRT3 i Robo1 és específica i es dona amb els dominis intracel·lulars d'ambdues proteïnes. A més a més, FLRT3 interacciona amb gran afinitat amb Robo1-CTF, un fragment de Robo1 que es genera pel processament del receptor per metaloproteases, i en cèl·lules HEK293T, FLRT3 segresta a aquest fragment a la membrana citoplasmàtica resultat que suggereix que FLRT3 regula negativament la senyalització canònica Slit-Robo.

1. Interacció FLRT3-Robo1

Els axons talamocorticals tenen un patró topogràfic molt ben establert, sent els axons rostrals enviats cap a la zona rostral de l'escorça (escorça motora), els axons intermedis cap a l'escorça intermèdia (escorça somatosensorial) i els axons caudals cap a l'escorça caudal (escorça visual) . Aquest patró es defineix en una regió anomenada "corridor" on hi ha expressades en forma de gradient diverses molècules de guia axonal, sent Slit1 i Netrin1 presents en grans concentracions en la zona rostral i en petites concentracions en la zona caudal i EfrinaA5 i Sema3A expressats de forma inversa, és a dir, petites concentracions en la zona rostral i grans en la zona caudal [354]. Gràcies a aquesta expressió gradual en el "corridor" d'aquestes molècules de guia axonal i a l'expressió regulada dels seus receptors específics en els cons de creixement dels axons talàmics és que s'estableix la topografia característica dels axons talamocorticals.

El nostre estudi ha aportat llum sobre com els axons talàmics rostrals es diferencien molecularment dels axons talàmics intermedis ja que tots dos tenen expressió similar

dels principals receptors de guia axonal [334] i travessen regions on la quantitat de Netrin1 i Slit1 és elevada, però, tot i així tenen respostes diferents; els rostrals són atrets per Slit1 i Netrin1, mentre que els intermedis no. Nosaltres, mitjançant la tècnica del doble híbrid i el posterior estudi en la línia cel·lular HEK293T i en cultius primaris del tàlem rostral, hem pogut identificar a FLRT3 com a molècula que marca la diferència en la resposta diferencial que presenten els axons rostrals respecte els intermedis. Hem vist que FLRT3 interacciona amb Robo1, receptor de la molècula de guia axonal Slit, en els axons rostrals fet que no pot ocórrer en els axons intermedis on l'expressió de FLRT3 hem vist que és gairebé inexistent. D'aquesta manera FLRT3 actua com a co-receptor de Robo1 en els axons talamocorticals rostrals. FLRT3 no és la primera vegada que es descriu com a co-receptor i tampoc com a modulador d'una resposta de senyalització. FLRT3 s'ha descrit que actua com a co-receptor de FGFR, tot i que, en aquest cas la interacció sigui entre els dominis extracel·lulars, concretament el domini FNIII de FLRT3, no com en el cas de Robo1 amb qui interacciona amb domini intracel·lular. També s'ha vist que modula positivament la senyalització FGF mitjançant l'activació de la via de les MAPK per promoure l'expressió dels gens diana de FGF, per aquesta funció és necessari el domini intracel·lular de FLRT3 [138][148]. A més a més, hem vist que igual que passa amb el receptor FGFR [148], amb Robo1 també pot interaccionar de forma lligand independent ja que la presència o no de Slit1 no fa que es perdi la interacció entre FLRT3 i Robo1.

A part d'interaccionar amb Robo1, FLRT3 d'alguna manera evita que es produeixi la resposta de repulsió a l'entrar en contacte amb Slit1. Hi ha dues evidències que ho suggereixen: els axons rostrals expressen FLRT3, Robo1 i també Robo2, en canvi els intermedis no tenen FLRT3. En primer lloc, el que van veure els grups amb qui vam col·laborar, és que la repulsió que es veu en els axons rostrals en presència de Slit1 ve senyalitzada per Robo2 i no per Robo1. I en segon lloc, que els axons intermedis que gairebé no tenen FLRT3 i que són Robo2^{-/-} també són repel·lits per Slit1, aquest cop mitjançant la senyalització que fa Robo1. Per tant, el que nosaltres postulem és que en els axons rostrals que expressen FLRT3, Robo1 i Robo2 la resposta de repulsió en presència de Slit1 ve generada per Robo2 perquè FLRT3 bloqueja l'activitat repulsiva de Robo1, mentre que en els axons intermedis que no expressen FLRT3 i tampoc

Robo2 la repulsió ve generada per Robo1 perquè FLRT3 no està present per bloquejar la seva activitat. Té sentit que la repulsió que veiem en els axons rostrals quan hi ha Slit vingui donada per Robo2 ja que FLRT3 interacciona específicament amb Robo1 i no amb Robo2, permetent així que Robo2 generi la resposta repulsiva. Aquest bloqueig de FLRT3 sobre Robo1 no sabem com succeeix, però haurien de passar dues coses, una que les molècules de senyalització per repulsió descrites fins al moment que intervenen en la resposta a Slit (Dock, PAK, Sos i Rac) [214] no s'uneixen a la part intracel·lular del receptor i dos que s'uneixin unes molècules de senyalització diferents a les habituals que activen el mecanisme que genera l'atracció. Nosaltres vam veure en les cèl·lules HEK293T que FLRT3 a part d'interaccionar amb el receptor sencer també interacciona amb el seu fragment intracel·lular, que és capaç de segrestar aquest fragment en la membrana i que els dominis citoplasmàtics conservats de Robo1 estan implicats en la interacció, dominis on les molècules de senyalització repulsiva s'uneixen [355][356][357][358][359][360]. També vam corroborar aquesta interacció tant amb el receptor sencer com amb el seu fragment intracel·lular en cultius primaris de neurones talàmiques rostrals. Per tant, en base a aquests resultats la nostra hipòtesi és que FLRT3 a l'interaccionar amb Robo1, tant amb el receptor sencer com amb el fragment intracel·lular, estaria evitant que les proteïnes de senyalització de repulsió s'uneixin al receptor possiblement mitjançant la generació d'un canvi en la conformació de Robo1 i unint-se al fragment intracel·lular que es genera en presència de Slit1, que és important perquè es senyalitzi la repulsió [210], i aquest fet estaria obrint la possibilitat de que es produís una nova senyalització que acaba amb un increment dels nivells de DCC en la membrana. No obstant, no tenim evidències de que les molècules de senyalització que de forma habitual intervenen en la resposta de repulsió a Slit1 (Dock, PAK, Sos i Rac) deixin d'interaccionar amb el receptor, però donat la resposta que veiem en presència de Slit1 i Netrin1 i el fet de que l'activitat de la quinasa ROCK sigui necessària perquè es produeixi l'increment de DCC en la membrana així ho suggereix.

2. La senyalització a través de ROCK promou atracció

ROCK és una RhoKinasa efectora de Rho que intervé en el control de l'organització del

citoesquelet mitjançant la inactivació de cofilina i de miosina per mitjà de LIMK i de MLC Fosfatasa, respectivament [188]. En el nostre context, els axons talamocorticals rostrals, ROCK intervé en la resposta d'atracció produïda per l'increment de DCC en la membrana. No obstant, en la majoria d'estudis s'ha associat l'activitat ROCK amb respostes de repulsió. ROCK regula negativament les primeres etapes del creixement axonal en neurones en cultiu [192], la disminució de l'expressió de Rho o ROCK s'ha vist que estimula el creixement neurític induït per DCC [350], l'activació de Rho/ROCK/LIMK inhibeix el creixement neurític en neurones granulars del cerebel [351], Sema3A activa Rho i ROCK i atenua la polimerització [361], Sema4D per mitjà de PlexinaB1, en neurones hipocampals, activa Rho i genera una resposta de repulsió [362]. També s'ha associat l'activitat de ROCK amb la senyalització repulsiva que generen Slit1 i Netrin1 sobre els axons cranials motors en el "floor plate". Concretament, s'ha descrit que Slit1, per mitjà de Robo1 i Robo2, i Netrin, per mitjà de Unc5A, cooperen per induir una resposta de repulsió en aquests axons cranials i que aquesta senyalització que desencadenen està generada per l'activació de ROCK, MLCK i miosinall [363]. En canvi, també hi ha algun estudi on relacionen Rho/ROCK amb respostes diferents a la repulsió; descriuen que una inhibició transitòria de Rho és necessària per produir col·lapse del con de creixement [364], per tant, la seva inactivació és la important per aquesta resposta, o en neurones precerebelars (PCN) s'ha vist que Rho intervé en la seva migració induïda per Netrin [353]. ROCK no és la única molècula de senyalització la qual s'associa a diferents respostes, a Rac li ocorre més o menys el mateix. En *D. melanogaster* s'han descrit RacGAPs i RacGEFs específiques que s'uneixen directament a Robo1 per regular l'activitat de Rac en la repulsió axonal que té lloc en la línia mitja i la migració de les cèl·lules traqueals. Una RacGAP, anomenada CrGAP/Vilse, contribueix a la resposta de repulsió que fa Slit mitjançant Robo tant en els axons de la línia mitja com en les cèl·lules traqueals [356][357]. Tant la sobreexpressió com l'expressió a nivells molt baixos de CrGAP/Vilse genera defectes en la senyalització Slit/Robo, per tant, uns determinats nivells precisos o una determinada distribució espacial de l'activitat CrGAP/Vilse pot ser instructiva per la repulsió que fa Robo. La RacGEF anomenada Sos és una reguladora de l'activació de Rac per mitjà de Robo. Interacciona amb Dock qui s'uneix a Robo i recluta PAK

[360][359]. En resposta a Slit, Sos que es troba en el citoplasma és reclutat cap a la membrana plasmàtica on co-localitza amb Robo i activa a Rac [358]. Slit i Robo utilitzen una RacGAP i una RacGEF per senyalitzar repulsió. Un complex de proteïnes són reclutades cap al receptor per desencadenar aquesta resposta repulsiva. L'activació coordinada de GEFs i GAPs segurament promou un cicle en l'activitat de Rac, que possiblement és més important que els nivells totals de Rac-GTP en els cons de creixement [154]. No obstant, l'activació de Rac no sempre promou repulsió; existeixen diversos exemples on l'activitat de Rac està implicada en respostes d'atracció. En cèl·lules de neuroblastoma N1E-115 l'activitat de Rac i de Cdc42 són necessàries per induir creixement neurític depenent de DCC i en fibroblasts després de l'estimulació amb Netrin hi ha una activació de Rac [350]. Fet que suggereix que l'estimulació de DCC per Netrin provoca una activació de Rac que és important per desencadenar la resposta d'atracció. En rata, Netrin indueix creixement neurític dels axons comissurals de la medulla espinal i requereix l'activitat de Rac i de Cdc42 [365]. Un exemple on la relació entre activitat de Rac i resposta d'atracció o repulsió no està tan clar és el que passa en neurones tractades amb EfrinaA2. Aquestes neurones estimulades amb EfrinaA2 pateixen una disminució transitòria de l'activitat Rac, però perquè hi hagi col·lapse del con de creixement ha d'haver-hi una reactivació de Rac que intervé en la internalització del complex lligand-receptor [366]. Per tant, com hem vist amb tots aquests exemples de ROCK i Rac, una mateixa molècula de senyalització segons els nivells d'activitat que tingui o el cicle entre activa-inactiva i el context en què es troba es capaç de desencadenar les diferents respostes de guia axonal. Encara que hi hagi establert un criteri que diu que les molècules atractives activen Rac i Cdc42 i inactiven RhoA, mentre que les molècules repulsives activen RhoA i inactiven Rac i Cdc42 [367][189], ha quedat demostrat amb diversos estudis que no sempre és així. És a dir, tot i que no sigui habitual associar a ROCK una resposta d'atracció és possible que en un determinat context pugui intervenir en una resposta d'aquest tipus, com és el cas dels axons talamocorticals rostrals.

La manera que té ROCK d'estar implicat en la resposta d'atracció que observem en aquests axons quan hi ha Slit1 i Netrin1 és que la seva activitat és essencial per produir l'increment dels nivells de DCC en la membrana, fet indispensable perquè es produeixi

l'atracció. Sabem que ROCK és fonamental en aquest procés perquè al tractar neurones talàmiques rostrals amb el seu inhibidor, aquest increment dels nivells de DCC es veu bloquejat. Diversos estudis han mostrat que un increment dels nivells de DCC en la membrana promou l'atracció induïda per Netrin1. En neurones comissurals de la medul·la espinal s'ha vist que Netrin1 incrementa els nivells de DCC en la membrana, que l'activitat de PKA potencia la mobilització del DCC que es troba emmagatzemat en vesícules intracel·lulars cap a la membrana plasmàtica i que la translocació de DCC a la superfície cel·lular incrementa la resposta de creixement axonal induïda per Netrin1 [163]. En neurones corticals s'ha vist que Netrin1 indueix un increment dels nivells de DCC en la membrana [368]. També en aquestes neurones s'ha descrit que PKA indueix l'increment de DCC en la membrana i que promou el creixement neurític. La despolarització de la membrana en neurones corticals, però no en neurones comissurals, incrementa els nivells de DCC en la membrana i el creixement axonal induït per Netrin1. A més a més, la inhibició de PKA, PI3K, PKC o de l'exocitosi bloqueja aquest increment de DCC en la membrana induït per la despolarització [348]. En aquests dos estudis relacionen l'activitat de PKA i la despolarització de la membrana amb l'increment dels nivells de DCC i la resposta d'atracció, en cap moment parlen de ROCK, però en un altre estudi veuen que en els axons comissurals Netrin1, per mitjà de DCC, inhibeix l'activitat Rho i que aquest bloqueig provoca l'increment de DCC en la membrana i promou el creixement axonal induït per Netrin1 [197]. Per tant, sembla que perquè hi hagi l'increment de DCC en la membrana és necessària l'activitat de PKA tant en els axons comissurals com en els axons corticals, la inhibició de Rho només s'ha descrit en axons comissurals i que la despolarització de la membrana és important per induir aquest increment de DCC en la membrana només s'ha vist en axons corticals. No obstant, una vegada més tornem a veure com dependent del context, del tipus cel·lular, les molècules i els processos que intervenen en donar una determinada resposta són diferents. Si tenim en compte això, el resultat que nosaltres tenim en els axons talamocorticals rostrals, tot i ser diferent a el que s'ha publicat fins el moment, és perfectament factible. Nosaltres hipotetitzem que mitjançant la interacció entre FLRT3 i Robo1 es produeix l'activació de ROCK i aquesta intervé en l'increment dels nivells de DCC en la membrana, fet que

desencadena la resposta d'atracció. D'una banda sabem que en neurones talàmiques rostrals FLRT3^{-/-} o Robo1^{-/-} no es produeix l'increment de DCC en la membrana, és a dir, és necessiten ambdues proteïnes, d'altra banda sabem que la interacció entre FLRT3 i Robo1 és necessària per regular l'activitat de Robo1 ja que quan no hi ha expressió de FLRT3, Robo1 pot senyalitzar repulsió, fet que no succeeix quan s'expressa FLRT3, i finalment sabem que l'activitat de ROCK és necessària per induir l'increment de DCC en la membrana. No hem estudiat com FLRT3/Robo1 activen ROCK i tampoc hem identificat les molècules de senyalització que hi ha per sota de ROCK, però donats els resultats obtinguts creiem que la interacció entre FLRT3 i Robo1 és necessària per aquesta activació i el subseqüent increment de DCC en la membrana en presència de Slit1 i Netrin1. En cap moment hem pensat que ROCK sigui activat inicialment per DCC i no per Robo1-FLRT3 degut a que en cultius de neurones talàmiques FLRT3^{-/-} i també en cultius de neurones talàmiques Robo1^{-/-} l'increment de DCC en la membrana no es produeix, resultat que indica que perquè hi hagi aquest increment ambdós proteïnes són necessàries i per tant, i donat que perquè hi hagi aquest increment és necessària l'activitat ROCK, pensem que són FLRT3 i Robo1 qui activen ROCK. El que no sabem és si un cop s'ha produït l'increment de DCC a la membrana hi ha un "feedback" positiu generat per la senyalització Netrin/DCC que fa que s'activi més ROCK i que el tràfic de DCC cap a la membrana es produeixi durant més temps. Tampoc hem caracteritzat el tràfic de DCC a la membrana al llarg de temps i no sabem si existeix un punt on hi ha un màxim de DCC a la membrana i després disminueix o si hi ha un increment en els nivells de DCC en la membrana que perdura durant un temps concret. Per tant, tampoc sabem si aquest "feedback" positiu que he mencionat existeix.

3. Combinació de molècules de guia axonal: Slit i Netrin, juntes promouen atracció

Un nou mecanisme que tampoc s'havia publicat fins el moment i que succeeix en els axons talàmics rostrals és que la presència de Slit1 i Netrin1 indueix atracció, quan per separat desencadenen respostes totalment diferents; Netrin no té cap efecte i Slit és repulsiu. En diversos contextos els axons es veuen confrontats a nivells elevats de Slit i

Netrin i segons els axons la interpretació és diferent per generar els diversos patrons específics que tenen els tractes axonals (**Figura 57**).

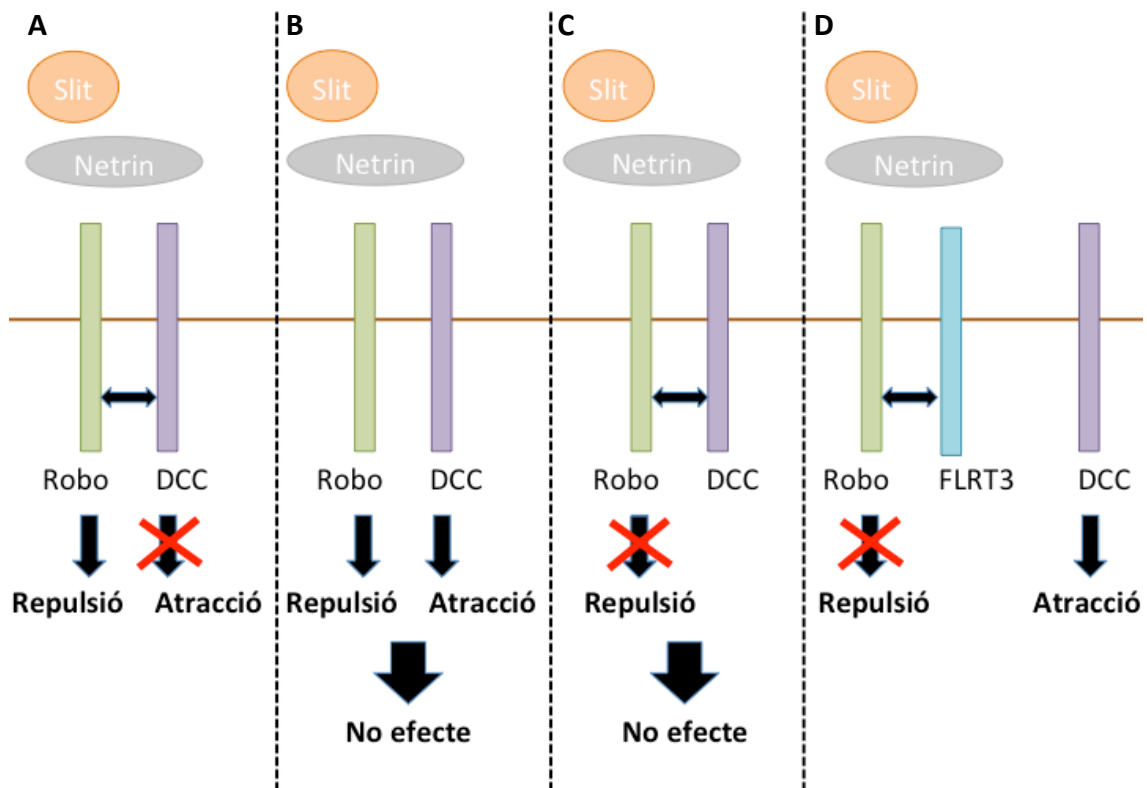


Figura 57 Relació entre Slit i Netrin en diferents contextos biològics. A) En els axons comissurals de la línia mitjana de la medul·la espinal de *X. laevis* i de *D. melanogaster* la relació que existeix entre Robo i DCC és una relació jeràrquica en la qual Robo silencia a DCC mitjançant la seva interacció. B) En les motoneurons de la medul·la espinal que innerven els músculs o en els axons longitudinals pioners del romboencèfal, fascicle longitudinal medial, les senyals repulsiva, Slit/Robo, i atractiva, Netrin/DCC, es contraresten entre elles. Les motoneurons no migren i els axons longitudinals no canvien la seva posició. C) En els axons provinents de l'escorça que formen el cos callós mitjançant la interacció entre DCC i Robo, la senyalització Netrin/DCC bloqueja l'efecte de repulsió que genera la senyalització Slit/Robo. El resultat és un no efecte que permet a aquests axons creuar la línia mitjana del cós callós. D) En els axons talàmics rostrals existeix una relació permissiva entre Slit i Netrin. Es requereix Slit perquè Netrin senyalitzi atracció. La interacció entre FLRT3 i Robo1 bloqueja la resposta de repulsió de Robo1.

En el "floor plate" de la medul·la espinal de *X. laevis* hi ha expressió de Slit i Netrin, en primer lloc Netrin mitjançant DCC atreu els axons comissurals cap a la línia mitjana i aquests la creuen i en segon lloc hi ha un increment dels nivells de Robo1 en la membrana que amb la unió a Slit i la posterior interacció amb DCC fa que aquests axons perdin la sensibilitat a Netrin i amb aquest mecanisme s'evita que els axons

recreuin la línia mitja. En aquest cas, la senyalització Slit/Robo silencia l'atracció induïda per Netrin [219] (**Figura 57A**). En la línia mitja de *D. melanogaster* també hi ha expressió de Netrin i de Slit, tot i que en aquest context també hi ha una relació jeràrquica entre ambdues molècules de guia axonal es creu que el mecanisme és lleugerament diferent. En aquest organisme Netrin també atreu els axons comissurals cap la línia mitja i Slit s'encarrega d'evitar el recreuament d'aquests i el creuament dels axons ipsilaterals. Suggereixen que si el silenciament de l'atracció és necessari per prevenir que els axons comissurals recreuin la línia mitja, Netrin no és l'única molècula que intervé en l'atracció i postulen dues possibles funcions per la senyalització Slit/Robo; una que inhibeix la funció Netrin/DCC durant la guia dels axons pioners longitudinals i dos que té un paper repulsiu independentment de Netrin/DCC per prevenir el creuament ectòpic de la línia mitja (**Figura 57A**). A més a més, en absència de DCC els axons recreuen la línia mitja indicant que el silenciament de DCC no és totalment requerit per prevenir aquest recreuament, fet que contrasta amb el que s'havia trobat en *X. laevis*. Per tant, pot ser que el silenciament no passi i que si passa la repulsió de Robo és suficient per prevenir el recreuament o hi ha funcions atractives addicionals que també han de ser silenciades en els axons que ja han creuat la línia mitja [369]. Amb aquests dos exemples es fa evident que tot i ser el mateix context, la línia mitja, i haver-hi expressió de les mateixes molècules el mecanisme de regulació de la guia axonal és diferent segons l'organisme. Un altre context on trobem l'expressió conjunta de Slit i Netrin és en el "floor plate". Les motoneurones es generen a prop del "floor plate" dorsalment, reben informació d'altres parts i projecten cap els músculs. En teixit on no hi ha expressió de Robo1 i Robo2 o de Slit1-3 les motoneurones neixen en la localització correcta, però llavors migren tangencialment cap a la part ventral de la línia mitja i projecten longitudinalment dintre del "floor plate" no podent arribar als punts diana normals. En teixit on no hi ha expressió de Netrin o de DCC aquestes motoneurones es mouen dorsalment suggerint que la senyalització Netrin/DCC té la funció d'atreure-les a prop del "floor plate". En aquest exemple veiem com en condicions normals les motoneurones, que tenen la propietat intrínseca de migrar, es troben estàtiques en una determinada posició gràcies a la repulsió produïda per la senyalització Slit/Robo i a l'atracció produïda per la

senyalització Netrin/DCC. En aquest mecanisme no hi ha una relació jeràrquica entre Slit i Netrin, sinó que les senyals es contraresten i les motoneurons es queden en una posició fixa gràcies al balanç entre les senyals de repulsió i d'atracció [370] (**Figura 57B**). Un altre exemple de relació no jeràrquica entre Slit i Netrin té lloc en els axons longitudinals pioners del romboencèfal, fascicle longitudinal medial. Quan no hi ha expressió de DCC en aquests axons o de Netrin en la línia mitja, els axons longitudinals s'allunyen de la línia mitja ventral, fet que suggereix que la senyalització Netrin/DCC actua atraient ventralment als axons. Al contrari, la senyalització repulsiva Slit/Robo desplaça de la part ventral de la línia mitja a aquests axons pioners. També s'ha vist que Slit i Netrin actuen sinèrgicament per promoure creixement axonal. Per tant, les trajectòries longitudinals són posicionades gràcies a un balanç entre l'atracció i repulsió de les molècules Netrin i Slit, ja que aquests axons longitudinals responen directament i simultàniament a ambdós tipus de senyals [371] (**Figura 57B**). Un cas similar al que nosaltres hem descrit, però amb efectes inversos, és el que té lloc en els axons callosos. En aquest cas la senyalització Netrin/DCC regula la formació del cos callós mitjançant l'atracció dels axons pioners i modulant la repulsió induïda per Slit. Inicialment, Netrin atreu els axons callosos pioners provinents de l'escorça cingulada, però no als axons callosos provinents de l'escorça, que són els que formen el gruix del cos callós, en etapes posteriors. De forma individual Slit és repulsiu per aquests axons i Netrin atractiu, però la combinació de les dues molècules de guia no desencadena cap efecte. La senyalització de Netrin/DCC evita la repulsió induïda per Slit en els axons que encara no han creuat la línia mitja, permetent-los així arribar-hi i creuar-la. El mecanisme proposat és que Netrin per mitjà de la interacció entre DCC i Robo silencia la senyalització repulsiva de Slit, ja que s'ha vist que ambdós receptors interaccionen sempre, independentment de si hi ha Netrin, Slit o Netrin i Slit conjuntament i que en teixit on no hi ha expressió de DCC en presència de Slit i Netrin es passa de tenir un no efecte a tenir repulsió. Un cop aquests axons han creuat la línia mitja l'expressió de DCC disminueix i així es permet que puguin avançar [244] (**Figura 57C**). Com hem pogut veure les molècules Slit i Netrin, depenent del context en què es troben, poden relacionar-se de diverses maneres. Poden tenir una relació jeràrquica on un silencia l'activitat de l'altre o poden actua conjuntament generant-se un balanç entre repulsió i

atracció. En el nostre cas Slit és necessari perquè Netrin, per mitjà de DCC, senyalitzi atracció (**Figura 57D**). En els nostres resultats hem vist que DCC i Robo1 interaccionen tant en condicions basals com en presència de Slit i Netrin, aquest fet correlaciona amb el que s'ha vist en els axons callosos [244] i ens podria fer pensar que existeix una regulació directa de l'activitat d'algun dels dos receptors per part de l'altre. No obstant, en el tàlem rostral a part de Robo1 i DCC també hi ha FLRT3, i és en aquest context on FLRT3 marca la diferència ja que hem vist en cèl·lules HEK293T que la seva co-expressió amb Robo1 i DCC trenca la interacció entre aquests últims i això deixaria DCC lliure per poder respondre a Netrin1 i generar la resposta d'atracció. És a dir, nosaltres proposem que en els axons talàmics intermedis, que no expressen FLRT3, Robo1 i DCC estarien interaccionant i seria Robo1 qui silenciaria a DCC i generaria una resposta de repulsió en presència de Slit1 i Netrin1. En canvi en el axons talàmics rostrals, que expressen FLRT3, aquesta interacció es veuria trencada per la presència de FLRT3 i el receptor DCC quedaria lliure i podria senyalitzar la resposta d'atracció que observem. A més a més, la senyalització Slit/Robo1 es veu bloquejada per la interacció entre FLRT3 i Robo1. Donada la relació jeràrquica que s'ha descrit entre Robo1 i DCC en els estudis anteriorment anomenats també es podia pensar que en el nostre model, els axons talàmics rostrals, fos DCC qui reprimeix la senyalització repulsiva de Robo1. Es va descartar aquesta possibilitat ja que en els axons talàmics intermedis, que expressen Robo1 i DCC, Slit desencadena una senyalització de repulsió per mitjà de Robo1 i Robo2, és a dir, tot i que la interacció entre Robo1 i DCC no sabem si es dona en aquest axons intermedis no sembla haver-hi cap relació jeràrquica de DCC sobre Robo1 ja que la senyalització repulsiva Slit/Robo1 es pot desencadenar perfectament. Seria FLRT3, qui gairebé no s'expressa en els axons intermedis i s'expressa a nivells alts en els axons rostrals, qui estaria regulant la resposta de Robo1 en presència de Slit1. Per tant, el que nosaltres suggerim és que no existeix aquesta relació jeràrquica entre DCC i Robo1, sinó que és FLRT3 qui mitjançant la interacció amb Robo1 bloqueja la seva activitat i és això el que permet que es produeixi la senyalització d'atracció de Netrin/DCC. És a dir, presentem un nou model on la interacció entre DCC i Robo1 no és qui regeix el mecanisme de guia axonal que té lloc, sinó que és FLRT3 qui està darrera del control d'aquest procés que té lloc en els axons talàmics rostrals.

4. Processament de Robo1 per metaloproteases en el tàlem rostral

En aquests axons també hem vist que Robo1 es processa a nivell basal, però que en presència de Slit1 aquest processament es veu incrementat. El processament de receptors és un mecanisme important que contribueix a l'activació dels receptors i modula les respostes de guia axonal. Per exemple, s'ha vist que la interacció entre la metaloproteasa Kuzbanian i els lligands Efrina i els receptors Eph és important per generar la resposta de repulsió per contacte. L'EfrinaA2 forma un complex estable amb Kuzbanian en absència del receptor Eph, però un vegada l'Efrina s'uneix al receptor la metaloproteasa és activada i processa a EfrinaA2, mecanisme necessari per promoure la repulsió ja que la unió entre Efrina i el receptor Eph promou l'adhesió entre ambdues cèl·lules [206]. Un mecanisme similar ha set descrit pel receptor EphB2 [208]. En motoneurons de la medul·la espinal s'ha descrit recentment que el processament d'EphA4 és important per establir una concentració diferencial d'Efrines actives en el teixit diana que és necessari per una correcta guia axonal [372]. També el receptor DCC s'ha associat al processament per metaloproteases. S'ha vist que la inhibició de l'activitat metaloproteasa potencia l'efecte de Netrin possiblement degut a una estabilització de DCC en la membrana de l'axó, ja que hi ha més expressió del receptor [205]. També s'ha vist que DCC després de ser processat per la part extracel·lular i generar el fragment DCC-stub ancorat a la membrana, és processat per la part intracel·lular per γ -secretasa i que el fragment generat és capaç de regular activitat transcripcional [373]. En motoneurons de la medul·la espinal s'ha vist que Netrin indueix la formació d'aquest fragment DCC-stub i que és important per incrementar la resposta cap a Netrin [374]. També s'ha vist processament de Robo1 per la metaloproteasa Kuzbanian en *D. melanogaster* després de la seva unió amb Slit, fet necessari perquè el receptor pateixi un canvi de conformació i les molècules de senyalització puguin unir-se i generar la resposta de repulsió [210]. A més a més, en cèl·lules tumorals s'ha vist que la part intracel·lular és processada també per γ -secretasa i que el fragment intracel·lular generat es transloca al nucli [331]. FLRT2 i FLRT3 també són processats en neurones corticals per metaloproteases, fet que està associat a una funció cel·lular no autònoma. Concretament, el domini extracel·lular alliberat és capaç de generar una resposta de repulsió per mitjà dels receptors Unc5 en

una subpoblació de neurones que es troben en la SVZ de l'escorça cerebral. Aquesta funció de repulsió és important per regular la migració d'aquesta subpoblació neuronal [147]. No sabem si FLRT3 en el nostre model, els axons talàmics rostrals, s'està processant i tampoc si el possible fragment generat, que no conté la part extracel·lular, interacciona amb Robo1 ja que l'anticòs utilitzat per fer les immunoprecipitacions reconeix una regió extracel·lular de FLRT3 i només hem pogut detectar el Robo1 que interacciona amb FLRT3 sencer. En el cas que FLRT3 fos processat es podria pensar que a l'igual que genera una resposta mitjançant Unc5 podria desencadenar una resposta mitjançant DCC i actuar així com lligand de dos dels receptors de Netrin, DCC i Unc5. No hem contemplat que aquest fet sigui possible ja que es van fer uns experiments per veure si FLRT3 podia unir-se a DCC (resultats no mostrats) i vam observar que aquesta unió no tenia lloc.

Són nombrosos els receptors que pateixen processament per metaloproteases en la seva part extracel·lular i aquest mecanisme és necessari per la seva activació. En el nostre cas no hem estudiat si hi havia processament del fragment intracel·lular de Robo1 que es genera després de l'acció de les metaloproteases, però donat que hem vist que aquest fragment és segrestat per FLRT3 segurament aquest darrer mecanisme no tindria lloc. Un procés que no hem comprovat en la condició Slit1 + Netrin1 és si aquest processament també ocorre i si FLRT3 en aquella condició també segresta el fragment intracel·lular del receptor. Tot i així, el que sembla que estigui passant és que Slit1 fa que Robo1 es processi, tot i així no pot senyalitzar repulsió perquè FLRT3 interacciona amb ell, tant amb el receptor sencer com amb el fragment intracel·lular generat. Per tant, tot i que el processament per metaloproteases sigui un mecanisme pel qual els receptors s'activen, en el nostre model això no té lloc donada l'expressió de FLRT3. Un resultat obtingut en les cèl·lules HEK293T, però no comprovat en cultius de tàlem rostral, és que la simple co-expressió de FLRT3 amb Robo1 fa que hi hagi un increment en el processament del receptor. Això podria explicar-se perquè quan FLRT3 interacciona amb Robo1 es produeix un canvi de conformació en el receptor que facilita l'activitat de les metaloproteases, com succeeix a EfrinaA2 qui quan s'uneix al seu receptor Eph canvia la seva conformació i exposa una seqüència de reconeixement per Adam10 que resulta en una millora del posicionament del domini proteasa

respecte el substrat [207].

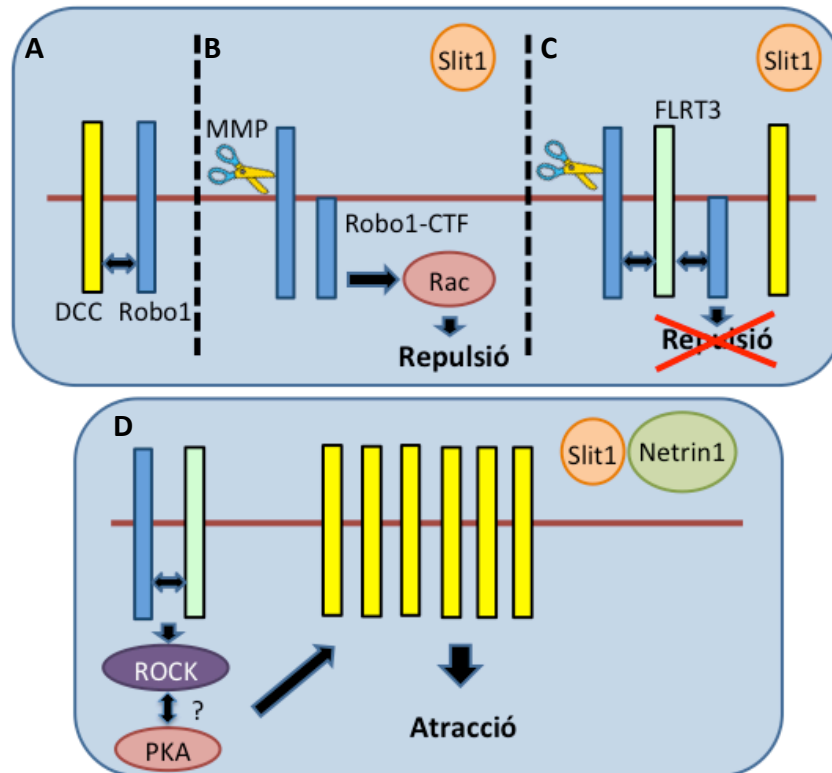


Figura 58 Esquema dels resultats obtinguts. A) Quan no hi ha FLRT3, per exemple com ocorre en els axons talàmics intermedis, DCC i Robo1 interaccionen. B) En els TCAs intermedis, i no en els rostrals, Robo1 és capaç de generar una resposta de repulsió. En un altre context biològic, s'ha descrit que en presència de Slit, Robo1 és processat per metaloproteases (MMP), que es genera un fragment anomenat Robo1-CTF i que es produeix l'activació de Rac qui finalment provoca la resposta de repulsió. Nosaltres, en TCAs rostrals hem vist que la presència de Slit1 estimula el processament de Robo1 per metaloproteases (MMP) i es genera el fragment Robo1-CTF, que inclou el domini intracel·lular del receptor. C) En cèl·lules HEK293T la presència de FLRT3 trenca la interacció entre DCC i Robo1, fet que allibera a DCC en la membrana. A més a més, FLRT3 interacciona tant amb Robo1 com amb Robo1-CTF independentment de la presència de Slit1, tant en cèl·lules HEK293T com en neurones talàmiques rostrals, i estaria bloquejant la senyalització canònica Slit/Robo de repulsió. La co-expressió de FLRT3 estimula el processament de Robo1 en cèl·lules HEK293T. D) En presència de Slit1 i Netrin1 i en neurones talàmiques rostrals la interacció entre FLRT3 i Robo1, no sabem si amb el receptor sencer i/o amb el fragment processat, activa les molècules de senyalització ROCK i PKA, fet necessari perquè es produeixi l'increment dels nivells de DCC en la membrana que finalment desencadenarà la resposta d'atracció que hem observat en els axons talàmics rostrals.

Per resumir, el model que nosaltres proposem és el següent: Slit1 promou el processament del seu receptor, Robo1. Al mateix temps FLRT3 està interaccionant

amb el receptor i podria estar ajudant a que es descobrís la seqüència de reconeixement per metaloproteases. Un cop el processament té lloc, FLRT3 interacciona amb el fragment intracel·lular de Robo1 que es genera i el segresta a la membrana. Possiblement amb aquesta interacció FLRT3 evita que aquest fragment sigui processat per γ -secretasa i que pugui tenir una funció relacionada amb la transcripció com passa a molts receptors i també estaria evitant que es desencadenés la resposta de repulsió. És a dir, FLRT3 regula negativament la senyalització Slit/Robo. D'altra banda, en presència de Slit1 i Netrin1, aquesta interacció seria important per activar l'activitat de la quinasa ROCK qui al seu torn està implicada en que es produeixi l'increment dels nivells de DCC en la membrana perquè es pugui generar la resposta d'atracció i els axons talàmics rostrals puguin mantenir la topografia correcta.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi han permès identificar una nova proteïna que interacciona amb Robo1 i que és capaç de modular la senyalització Slit/Robo1. A més a més, s'ha descrit que Robo1 és processat per metaloproteases en el tàlem i que FLRT3 mitjançant la interacció amb Robo1 és capaç de potenciar indirectament la senyalització Netrin/DCC. Per tant, FLRT3 és una proteïna que a part d'intervenir en mecanismes d'adhesió cel·lular i de repulsió, té un paper fonamental en la guia axonal dels axons talamocorticals.

CONCLUSIONS

1. FLRT3 interacciona amb el receptor de guia axonal Robo1, per Doble Híbrid, en cèl·lules HEK293T i en cultiu *in vitro* de neurones talàmiques rostrals.
2. La interacció entre FLRT3 i Robo1 és específica ja que FLRT3 no interacciona amb Robo2, un altre membre de la família de receptors, en cèl·lules HEK293T.
3. La interacció entre FLRT3 i Robo1 es dona pels dominis intracel·lulars de les dues proteïnes en cèl·lules HEK293T i els dominis conservats en Robo1 CC1, CC2 i CC3 hi intervenen.
4. Robo1 és processat en neurones talàmiques rostrals en cultiu alliberant un domini intracel·lular i aquest procés es veu estimulat per la presència del seu lligand, Slit.
5. El processament de Robo1 en neurones talàmiques rostrals en cultiu és produït per una activitat metaloproteasa.
6. FLRT3 promou el processament de Robo1 en les cèl·lules HEK293T.
7. FLRT3 interacciona amb el fragment intracel·lular de Robo1 amb més afinitat que amb el receptor sencer, en cèl·lules HEK293T i en cultiu *in vitro* de neurones talàmiques rostrals.
8. FLRT3 segresta a la membrana al fragment intracel·lular de Robo1 en cèl·lules HEK293T.
9. FLRT3 i Robo1 són necessaris en la guia axonal dels axons talamocorticals rostrals. Concretament, intervenen en la senyalització que es desencadena en presència de Slit1 i Netrin1 perquè hi hagi un increment en els nivells de DCC en la membrana i la posterior resposta d'atracció.
10. L'activitat de la quinasa ROCK és necessària perquè es produeixi la senyalització d'atracció en resposta a Slit1 i Netrin1 en neurones talàmiques rostrals en cultiu.
11. FLRT3 no intervé directament en la senyalització Netrin/DCC ni en cèl·lules

HEK293T ni en neurones talàmiques rostrals en cultiu .

12. Robo1 i DCC interaccionen amb o sense Slit1 i/o Netrin1 en cèl·lules HEK293T.

13. FLRT3 trenca la interacció entre Robo1 i DCC en cèl·lules HEK293T.

TREBALL FUTUR

Algunes de les coses fonamentals que s'haurien de fer per continuar amb aquest projecte és estudiar què passa en relació amb el processament de Robo1 per metalloproteases en els axons talàmics rostrals en presència de Slit1 i Netrin1. Esperaríem que el processament es produís igualment, ja que nosaltres postulem que tot i que el processament es dona, és FLRT3 qui bloqueja la resposta de repulsió Slit1/Robo1. Per estudiar això, es podrien fer el mateix tipus d'experiment que el fet fins a les hores, cultivar neurones talàmiques rostrals, immunoprecipitar Robo1 i per western-blot analitzar els resultats. Un altre experiment interessant podria ser electroporar en axons talàmics intermedis (que no expressen FLRT3) que fossin Robo2^{-/-}, un Robo1 que no es pogués processar i veure si la resposta de repulsió que Slit1 desencadena per mitjà de Robo1 en aquests axons es dona. Esperaríem que la resposta de repulsió no es donés i així sabríem que en els axons talàmics intermedis perquè es produeixi la resposta de repulsió per mitjà de Robo1 és necessari el processament. D'aquesta manera demostrariem per primera vegada que el processament de Robo1 en el sistema nerviós de mamífers és essencial perquè desencadeni la resposta de repulsió. Seguidament, s'hauria de comprovar que realment FLRT3 està bloquejant la senyalització repulsiva Slit1/Robo1. Esperaríem que en absència de FLRT3 el processament es donés igualment, però que a més a més hi hagués efecte repulsiu en presència de Slit1. Per evitar que l'efecte repulsiu que veiéssim fos generat per Robo2, s'haurien de fer els experiments amb teixit que no tinguis expressió ni de Robo2 ni de FLRT3. El procediment podria ser fer assajos de confrontació amb explants de tàlem rostral dobles knock-out per FLRT3 i Robo2, i confrontar-los a cèl·lules que secretessin al medi Slit1. Aquests ratolins dobles knock-out per FLRT3 i Robo2 no existeixen i portaria molt temps generar-los, així que la millor opció seria utilitzar shRNA contra els mRNAs de FLRT3 i Robo2. Finalment, i continuant amb aquesta línia, es podria estudiar si les molècules necessàries perquè Robo1 senyalitzi repulsió (Dock, Sos, etc.) s'uneixen al receptor en presència de FLRT3. Per això es podrien fer assajos de co-immunoprecipitació en HEK293T transfectades amb els plàsmids d'expressió que codifiquen per aquestes proteïnes juntament amb Robo1 i FLRT3 i depenent del resultat obtingut veure què passa en neurones talàmiques rostrals utilitzant assajos similars.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Rakic, "The radial edifice of cortical architecture: From neuronal silhouettes to genetic engineering," *Brain Res. Rev.*, vol. 55, pp. 204–219, 2007.
- [2] L. C. Greig, M. B. Woodworth, M. J. Galazo, H. Padmanabhan, and J. D. Macklis, "Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 14, no. 11, pp. 755–69, 2013.
- [3] C. Dehay and H. Kennedy, "Cell-cycle control and cortical development.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, no. June, pp. 438–450, 2007.
- [4] W. Haubensak, A. Attardo, W. Denk, and W. B. Huttner, "Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 9, pp. 3196–3201, 2004.
- [5] S. C. Noctor, V. Martínez-Cerdeño, L. Ivic, and A. R. Kriegstein, "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases.," *Nat. Neurosci.*, vol. 7, no. 2, pp. 136–144, 2004.
- [6] X. Wang, J.-W. Tsai, B. LaMonica, and A. R. Kriegstein, "A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex.," *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 5, pp. 555–561, 2011.
- [7] V. Martínez-Cerdeño, C. L. Cunningham, J. Camacho, J. L. Antczak, A. N. Prakash, M. E. Cziep, A. I. Walker, and S. C. Noctor, "Comparative analysis of the subventricular zone in rat, ferret and macaque: Evidence for an outer subventricular zone in rodents," *PLoS One*, vol. 7, no. 1, 2012.
- [8] T. Miyata, A. Kawaguchi, H. Okano, and M. Ogawa, "Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons," *Neuron*, vol. 31, no. 5, pp. 727–741, 2001.
- [9] M. B. Luskin and C. J. Shatz, "Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones.," *J. Neurosci.*, vol. 5, no. 4, pp. 1062–1075, 1985.
- [10] H. Wichterle, D. H. Turnbull, S. Nery, G. Fishell, and a Alvarez-Buylla, "In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain.," *Development*, vol. 128, no. 19, pp. 3759–3771, 2001.
- [11] Q. Xu, I. Cobos, E. De La Cruz, J. L. Rubenstein, and S. a Anderson, "Origins of cortical interneuron subtypes.," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 11, pp. 2612–2622, 2004.
- [12] S. a Anderson, O. Marín, C. Horn, K. Jennings, and J. L. Rubenstein, "Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences.,"

Development, vol. 128, no. 3, pp. 353–363, 2001.

- [13] G. Miyoshi, J. Hjerling-Leffler, T. Karayannis, V. H. Sousa, S. J. B. Butt, J. Battiste, J. E. Johnson, R. P. Machold, and G. Fishell, “Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 5, pp. 1582–1594, 2010.
- [14] D. M. Gelman, F. J. Martini, S. Nóbrega-Pereira, A. Pierani, N. Kessarlis, and O. Marín, “The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 29, pp. 9380–9389, 2009.
- [15] K. T. Sultan, K. N. Brown, and S.-H. Shi, “Production and organization of neocortical interneurons,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. November, p. 221, 2013.
- [16] A. B. Seven, Y. Xu, and J. Rizo, “Research Articles,” vol. 334, no. December, pp. 480–486, 2012.
- [17] a a Lavdas, M. Grigoriou, V. Pachnis, and J. G. Parnavelas, “The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex,” *J. Neurosci.*, vol. 19, no. 19, pp. 7881–7888, 1999.
- [18] O. Marín, a Yaron, a Bagri, M. Tessier-Lavigne, and J. L. Rubenstein, “Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions,” *Science*, vol. 293, no. 5531, pp. 872–875, 2001.
- [19] M. Yozu, H. Tabata, and K. Nakajima, “The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain,” *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 31, pp. 7268–7277, 2005.
- [20] E. S. B. C. Ang, T. F. Haydar, V. Gluncic, and P. Rakic, “Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex,” *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 13, pp. 5805–5815, 2003.
- [21] B. Nadarajah and J. G. Parnavelas, “Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 3, no. June, pp. 423–432, 2002.
- [22] I. Cobos, V. Broccoli, and J. L. R. Rubenstein, “The vertebrate ortholog of *Aristaless* is regulated by *Dlx* genes in the developing forebrain,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 483, no. 3, pp. 292–303, 2005.
- [23] P. Flandin, Y. Zhao, D. Vogt, J. Jeong, J. Long, G. Potter, H. Westphal, and J. L. R. Rubenstein, “*Lhx6* and *Lhx8* Coordinately Induce Neuronal Expression of *Shh* that Controls the Generation of Interneuron Progenitors,” *Neuron*, vol. 70, no. 5,

pp. 939–950, 2011.

- [24] J. E. Long, I. Cobos, and J. L. R. Rubenstein, “Dlx1 & 2 and Mash1 Transcription Factors Control MGE and CGE Patterning and Differentiation through Parallel and Overlapping Pathways Materials and Methods RNA Preparation and Gene Expression Array Analysis Tissue Preparation and In Situ Hybridization Res,” no. July, pp. 1–11, 2014.
- [25] N. Flames, R. Pla, D. M. Gelman, J. L. R. Rubenstein, L. Puellas, and O. Marín, “Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes.,” *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 36, pp. 9682–9695, 2007.
- [26] S. Nóbrega-Pereira, N. Kessar, T. Du, S. Kimura, S. a. Anderson, and O. Marín, “Postmitotic Nkx2-1 Controls the Migration of Telencephalic Interneurons by Direct Repression of Guidance Receptors,” *Neuron*, vol. 59, no. 5, pp. 733–745, 2008.
- [27] A. Chédotal and F. M. Rijli, “Transcriptional regulation of tangential neuronal migration in the developing forebrain,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 19, no. 2, pp. 139–145, 2009.
- [28] L. R. Hernández-Miranda, J. G. Parnavelas, and F. Chiara, “Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons.,” *ASN Neuro*, vol. 2, no. 2, p. e00031, 2010.
- [29] G. Miyoshi, S. J. B. Butt, H. Takebayashi, and G. Fishell, “Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors.,” *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 29, pp. 7786–7798, 2007.
- [30] S. a. Anderson, C. E. Kaznowski, C. Horn, J. L. R. Rubenstein, and S. K. McConnell, “Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo.,” *Cereb. Cortex*, vol. 12, no. 7, pp. 702–709, 2002.
- [31] Y. Yokota, H. T. Ghashghaei, C. Han, H. Watson, K. J. Campbell, and E. S. Anton, “Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex,” *PLoS One*, vol. 2, no. 8, 2007.
- [32] F. Polleux, K. L. Whitford, P. a. Dijkhuizen, T. Vitalis, and A. Ghosh, “Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling.,” *Development*, vol. 129, no. 13, pp. 3147–3160, 2002.
- [33] S. Poluch, B. Jablonska, and S. L. Juliano, “Alteration of interneuron migration in a ferret model of cortical dysplasia,” *Cereb. Cortex*, vol. 18, no. 1, pp. 78–92, 2008.
- [34] L. a. B. Elias, M. Turmaine, J. G. Parnavelas, and A. R. Kriegstein, “Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical

- interneurons.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 20, pp. 7072–7077, 2010.
- [35] M. Tessier-Lavigne and C. S. Goodman, "The molecular biology of axon guidance.," *Science*, vol. 274, no. 5290, pp. 1123–1133, 1996.
- [36] B. J. Dickson, "Molecular mechanisms of axon guidance.," *Science*, vol. 298, no. January, pp. 1959–1964, 2002.
- [37] E. W. Dent, F. Tang, and K. Kalil, "Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms.," *Neuroscientist*, vol. 9, no. 5, pp. 343–353, 2003.
- [38] C.-H. Lin and P. Forscher, "Cytoskeletal remodeling during growthcone-target interactions," *J. Cell Biol.*, vol. 121, no. 6, pp. 1369–1383, 1993.
- [39] T. P. O'Connor and D. Bentley, "Accumulation of actin in subsets of pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cues in situ," *J. Cell Biol.*, vol. 123, no. 4, pp. 935–948, 1993.
- [40] J. H. Sabry, T. P. O'Connor, L. Evans, a. Toroian-Raymond, M. Kirschner, and D. Bentley, "Microtubule behavior during guidance of pioneer neuron growth cones in situ," *J. Cell Biol.*, vol. 115, no. 2, pp. 381–395, 1991.
- [41] E. Tanaka and J. Sabry, "Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance.," *Cell*, vol. 83, no. 2, pp. 171–176, 1995.
- [42] a. K. Lewis and P. C. Bridgman, "Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity," *J. Cell Biol.*, vol. 119, no. 5, pp. 1219–1244, 1992.
- [43] S. Okabe and N. Hirokawa, "Actin dynamics in growth cones.," *J. Neurosci.*, vol. 11, no. 7, pp. 1918–1929, 1991.
- [44] C. H. Lin, E. M. Espreafico, M. S. Mooseker, and P. Forscher, "Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones," *Neuron*, vol. 16, no. 4, pp. 769–782, 1996.
- [45] A. Mallavarapu and T. Mitchison, "Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction," *J. Cell Biol.*, vol. 146, no. 5, pp. 1097–1106, 1999.
- [46] R. W. Gunderson and J. N. Barrett, "Characterization of the turning response of dorsal root neurites toward nerve growth factor," *J. Cell Biol.*, vol. 87, no. 3 I, pp. 546–554, 1980.
- [47] J. Q. Zheng, J. J. Wan, and M. M. Poo, "Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient.," *J. Neurosci.*,

- vol. 16, no. 3, pp. 1140–1149, 1996.
- [48] P. Letourneau and E. Macagno, “Mechanisms of growth cone guidance and motility in the developing grasshopper embryo,” *J. Neurobiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 271–280, 2000.
 - [49] S. R. Heidemann, P. Lamoureux, and R. E. Buxbaum, “Growth cone behavior and production of traction force,” *J. Cell Biol.*, vol. 111, no. 5, pp. 1949–1957, 1990.
 - [50] A. W. Schaefer, N. Kabir, and P. Forscher, “Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones,” *J. Cell Biol.*, vol. 158, no. 1, pp. 139–152, 2002.
 - [51] A. L. Kolodkin and M. Tessier-Lavigne, “Mechanisms and molecules of neuronal wiring: A primer,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 6, pp. 1–14, 2011.
 - [52] D. a. Colón-Ramos, “Chapter 2 Synapse Formation in Developing Neural Circuits,” *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 87, no. 09, pp. 53–79, 2009.
 - [53] O. Bukalo and a Dityatev, “Synaptic cell adhesion molecules,” *Adv Exp Med Biol*, vol. 970, pp. 97–128, 2012.
 - [54] M. Yamagata, J. R. Sanes, and J. a. Weiner, “Synaptic adhesion molecules,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 621–632, 2003.
 - [55] N. Giagtzoglou, C. V Ly, and H. J. Bellen, “‘Vertebrate’ and ‘Invertebrate’ Perspectives,” pp. 1–25, 2009.
 - [56] K. Shen and C. W. Cowan, “Plasticity,” pp. 1–18, 2010.
 - [57] A. M. Craig, E. R. Graf, and M. W. Linhoff, “How to build a central synapse: Clues from cell culture,” *Trends Neurosci.*, vol. 29, no. 1, pp. 8–20, 2006.
 - [58] J. K. Chilton, “Molecular mechanisms of axon guidance,” *Dev. Biol.*, vol. 292, pp. 13–24, 2006.
 - [59] C. Plachez and L. J. Richards, “Mechanisms of Axon Guidance in the Developing Nervous System,” *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 69, no. 05, pp. 267–346, 2005.
 - [60] K. Kullander and R. Klein, “Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 7, pp. 475–486, 2002.
 - [61] T. Kidd, K. Brose, K. J. Mitchell, R. D. Fetter, M. Tessier-Lavigne, C. S. Goodman, and G. Tear, “Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors,” *Cell*, vol. 92, no. 2, pp. 205–215, 1998.

- [62] R. Batty, a Stevens, and J. R. Jacobs, "Axon repulsion from the midline of the Drosophila CNS requires slit function.," *Development*, vol. 126, no. 11, pp. 2475–2481, 1999.
- [63] T. Kidd, K. S. Bland, and C. S. Goodman, "Slit is the midline repellent for the robo receptor in Drosophila.," *Cell*, vol. 96, no. 6, pp. 785–794, 1999.
- [64] K. Brose, K. S. Bland, K. H. Wang, D. Arnott, W. Henzel, C. S. Goodman, M. Tessier-Lavigne, and T. Kidd, "Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance.," *Cell*, vol. 96, no. 6, pp. 795–806, 1999.
- [65] H. S. Li, J. H. Chen, W. Wu, T. Fagaly, L. Zhou, W. Yuan, S. Dupuis, Z. H. Jiang, W. Nash, C. Gick, D. M. Ornitz, J. Y. Wu, and Y. Rao, "Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons.," *Cell*, vol. 96, no. 6, pp. 807–818, 1999.
- [66] K. H. Wang, K. Brose, D. Arnott, T. Kidd, C. S. Goodman, W. Henzel, and M. Tessier-Lavigne, "Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching.," *Cell*, vol. 96, no. 6, pp. 771–784, 1999.
- [67] J. C. Hao, T. W. Yu, K. Fujisawa, J. G. Culotti, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, G. Moulder, R. Barstead, M. Tessier-Lavigne, and C. I. Bargmann, "C. elegans slit acts in midline, dorsal-ventral, and anterior-posterior guidance via the SAX-3/Robo receptor," *Neuron*, vol. 32, no. 1, pp. 25–38, 2001.
- [68] V. Marillat, O. Cases, K. T. Nguyen-Ba-Charvet, M. Tessier-Lavigne, C. Sotelo, and A. Chédotal, "Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 442, no. 2, pp. 130–155, 2002.
- [69] J. M. Rothberg, J. Roger Jacobs, C. S. Goodman, and S. Artavanis-Tsakonas, "Slit: An extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains," *Genes Dev.*, vol. 4, no. 12, pp. 2169–2187, 1990.
- [70] K. T. Nguyen Ba-Charvet, K. Brose, L. Ma, K. H. Wang, V. Marillat, C. Sotelo, M. Tessier-Lavigne, and a Chédotal, "Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance.," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 12, pp. 4281–4289, 2001.
- [71] A. R. Ypsilanti, Y. Zagar, and A. Chédotal, "Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo.," *Development*, vol. 137, no. 12, pp. 1939–1952, 2010.
- [72] M. Little, B. Rumballe, K. Georgas, T. Yamada, and R. D. Teasdale, "Conserved modularity and potential for alternate splicing in mouse and human Slit genes,"

Int. J. Dev. Biol., vol. 46, no. 4 SPEC., pp. 385–391, 2002.

- [73] T. Tanno, S. Takenaka, and S. Tsuyama, “Expression and function of Slit1^{??}, a novel alternative splicing product for Slit1,” *J. Biochem.*, vol. 136, no. 5, pp. 575–581, 2004.
- [74] B. Hivert, Z. Liu, C.-Y. Chuang, P. Doherty, and V. Sundaresan, “Robo1 and Robo2 are homophilic binding molecules that promote axonal growth.,” *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 21, no. 4, pp. 534–545, 2002.
- [75] V. M. Bedell, S.-Y. Yeo, K. W. Park, J. Chung, P. Seth, V. Shivalingappa, J. Zhao, T. Obara, V. P. Sukhatme, I. a Drummond, D. Y. Li, and R. Ramchandran, “Roundabout4 Is Essential for Angiogenesis in Vivo.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 18, pp. 6373–6378, 2005.
- [76] C. a Jones, N. R. London, H. Chen, K. W. Park, D. Sauvaget, R. a Stockton, J. D. Wythe, W. Suh, F. Larrieu-Lahargue, Y.-S. Mukoyama, P. Lindblom, P. Seth, A. Frias, N. Nishiya, M. H. Ginsberg, H. Gerhardt, K. Zhang, and D. Y. Li, “Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability.,” *Nat. Med.*, vol. 14, no. 4, pp. 448–453, 2008.
- [77] V. Sundaresan, I. Roberts, a Bateman, a Bankier, M. Sheppard, C. Hobbs, J. Xiong, J. Minna, F. Latif, M. Lerman, and P. Rabbitts, “The DUTT1 gene, a novel NCAM family member is expressed in developing murine neural tissues and has an unusually broad pattern of expression.,” *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 11, no. 1–2, pp. 29–35, 1998.
- [78] Y. Yue, B. Grossmann, D. Galetzka, U. Zechner, and T. Haaf, “Isolation and differential expression of two isoforms of the ROBO2/Robo2 axon guidance receptor gene in humans and mice,” *Genomics*, vol. 88, no. 6, pp. 772–778, 2006.
- [79] Z. Chen, B. B. Gore, H. Long, L. Ma, and M. Tessier-Lavigne, “Alternative Splicing of the Robo3 Axon Guidance Receptor Governs the Midline Switch from Attraction to Repulsion,” *Neuron*, vol. 58, no. 3, pp. 325–332, 2008.
- [80] M. J. Barallobre, M. Pascual, J. a. Del Río, and E. Soriano, “The Netrin family of guidance factors: Emphasis on Netrin-1 signalling,” *Brain Res. Rev.*, vol. 49, no. 1, pp. 22–47, 2005.
- [81] J. G. Culotti and D. C. Merz, “DCC and netrins,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 609–613, 1998.
- [82] S. a Colamarino and M. Tessier-Lavigne, “The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons.,” *Cell*, vol. 81, no. 4, pp. 621–629, 1995.
- [83] M. L. Winberg, K. J. Mitchell, and C. S. Goodman, “Genetic analysis of the

mechanisms controlling target selection: Complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs," *Cell*, vol. 93, no. 4, pp. 581–591, 1998.

- [84] K. Keleman and B. J. Dickson, "Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 Netrin receptor," *Neuron*, vol. 32, no. 4, pp. 605–617, 2001.
- [85] M. S. Deiner, T. E. Kennedy, A. Fazeli, T. Serafini, M. Tessier-Lavigne, and D. W. Sretavan, "Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: Loss of function leads to optic nerve hypoplasia," *Neuron*, vol. 19, no. 3, pp. 575–589, 1997.
- [86] T. E. Kennedy, H. Wang, W. Marshall, and M. Tessier-Lavigne, "Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord.," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 34, pp. 8866–8874, 2006.
- [87] M. Koch, J. R. Murrell, D. D. Hunter, P. F. Olson, W. Jin, D. R. Keene, W. J. Brunken, and R. E. Burgeson, "A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization.," *J. Cell Biol.*, vol. 151, no. 2, pp. 221–234, 2000.
- [88] S. S. Y. Chan, H. Zheng, M. W. Su, R. Wilk, M. T. Killeen, E. M. Hedgecock, and J. G. Culotti, "UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues," *Cell*, vol. 87, no. 2, pp. 187–195, 1996.
- [89] P. a. Kolodziej, L. C. Timpe, K. J. Mitchell, S. R. Fried, C. S. Goodman, L. Y. Jan, and Y. N. Jan, "frazzled Encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance," *Cell*, vol. 87, no. 2, pp. 197–204, 1996.
- [90] K. Keino-Masu, M. Masu, L. Hinck, E. D. Leonardo, S. S. Y. Chan, J. G. Culotti, and M. Tessier-Lavigne, "Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor," *Cell*, vol. 87, no. 2, pp. 175–185, 1996.
- [91] K. Hong, L. Hinck, M. Nishiyama, M. M. Poo, M. Tessier-Lavigne, and E. Stein, "A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion," *Cell*, vol. 97, no. 7, pp. 927–941, 1999.
- [92] B. V. Geisbrecht, K. a. Dowd, R. W. Barfield, P. a. Longo, and D. J. Leahy, "Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 35, pp. 32561–32568, 2003.
- [93] I. Feoktistov and I. Biaggioni, "Adenosine A_{2B} Receptors," *Pharmacol. Rev.*, vol. 49, no. 4, pp. 381–402, 1997.
- [94] G. L. Andrews, S. Tanglao, W. T. Farmer, S. Morin, S. Brotman, M. a Berberoglu,

- H. Price, G. C. Fernandez, G. S. Mastick, F. Charron, and T. Kidd, "Dscam guides embryonic axons by Netrin-dependent and -independent functions.," *Development*, vol. 135, no. 23, pp. 3839–3848, 2008.
- [95] A. Ly, A. Nikolaev, G. Suresh, Y. Zheng, M. Tessier-Lavigne, and E. Stein, "DSCAM Is a Netrin Receptor that Collaborates with DCC in Mediating Turning Responses to Netrin-1," *Cell*, vol. 133, no. 7, pp. 1241–1254, 2008.
- [96] P. Mehlen, C. Delloye-Bourgeois, and A. Chédotal, "Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets?," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 3, pp. 188–197, 2011.
- [97] K. Hofmann and J. Tschopp, "The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance," *FEBS Lett.*, vol. 371, no. 3, pp. 321–323, 1995.
- [98] B. J. Dickson and K. Keleman, "Netrins.," *Curr. Biol.*, vol. 12, no. 5, pp. R154–R155, 2002.
- [99] M. Yebra, A. M. P. Montgomery, G. R. Diaferia, T. Kaido, S. Silletti, B. Perez, M. L. Just, S. Hildbrand, R. Hurford, E. Florkiewicz, M. Tessier-Lavigne, and V. Cirulli, "Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration.," *Dev. Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 695–707, 2003.
- [100] U. Drescher, C. Kremoser, C. Handwerker, J. Löschinger, M. Noda, and F. Bonhoeffer, "In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases.," *Cell*, vol. 82, no. 3, pp. 359–370, 1995.
- [101] N. W. Gale, S. J. Holland, D. M. Valenzuela, A. Flenniken, L. Pan, T. E. Ryan, M. Henkemeyer, K. Strebhardt, H. Hirai, D. G. Wilkinson, T. Pawson, S. Davis, and G. D. Yancopoulos, "Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis," *Neuron*, vol. 17, no. 1, pp. 9–19, 1996.
- [102] T. Cutforth and C. J. Harrison, "Ephs and ephrins close ranks," *Trends Neurosci.*, vol. 25, no. 7, pp. 332–334, 2002.
- [103] J. Huot, "Ephrin signaling in axon guidance," *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 28, no. 5, pp. 813–818, 2004.
- [104] I. D. Chin-Sang, S. E. George, M. Ding, S. L. Moseley, a S. Lynch, and a D. Chisholm, "The ephrin VAB-2/EFN-1 functions in neuronal signaling to regulate epidermal morphogenesis in *C. elegans*," *Cell*, vol. 99, no. 7, pp. 781–790, 1999.
- [105] X. Wang, P. J. Roy, S. J. Holland, L. W. Zhang, J. G. Culotti, and T. Pawson, "Multiple ephrins control cell organization in *C. elegans* using kinase-dependent

- and -independent functions of the VAB-1 Eph receptor.," *Mol. Cell*, vol. 4, no. 6, pp. 903–913, 1999.
- [106] a L. Scully, M. McKeown, and J. B. Thomas, "Isolation and characterization of Dek, a Drosophila eph receptor protein tyrosine kinase.," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 13, no. 5, pp. 337–347, 1999.
- [107] S. E. George, K. Simokat, J. Hardin, and A. D. Chisholm, "The VAB-1 Eph receptor tyrosine kinase functions in neural and epithelial morphogenesis in *C. elegans*," *Cell*, vol. 92, no. 5, pp. 633–643, 1998.
- [108] K. Brückner, E. B. Pasquale, and R. Klein, "Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors.," *Science*, vol. 275, no. 5306, pp. 1640–1643, 1997.
- [109] E. F. Schmidt, H. Togashi, and S. M. Strittmatter, "Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates," *Handb. Cell Signaling, 2/e*, vol. 2, pp. 1961–1966, 2010.
- [110] H. J. Cheng, A. Bagri, A. Yaron, E. Stein, S. J. Pleasure, and M. Tessier-Lavigne, "Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections," *Neuron*, vol. 32, no. 2, pp. 249–263, 2001.
- [111] R. J. Pasterkamp, "Getting neural circuits into shape with semaphorins," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 13, no. 9, pp. 605–618, 2012.
- [112] T. S. Tran, A. L. Kolodkin, and R. Bharadwaj, "Semaphorin regulation of cellular morphology.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, pp. 263–292, 2007.
- [113] L. Tamagnone and P. M. Comoglio, "Signalling by semaphorin receptors: Cell guidance and beyond," *Trends Cell Biol.*, vol. 10, no. 9, pp. 377–383, 2000.
- [114] L. Tamagnone, S. Artigiani, H. Chen, Z. He, G. L. Ming, H. J. Song, A. Chédotal, M. L. Winberg, C. S. Goodman, M. M. Poo, M. Tessier-Lavigne, and P. M. Comoglio, "Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates," *Cell*, vol. 99, no. 1, pp. 71–80, 1999.
- [115] M. L. Winberg, J. N. Noordermeer, L. Tamagnone, P. M. Comoglio, M. K. Spriggs, M. Tessier-Lavigne, and C. S. Goodman, "Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance," *Cell*, vol. 95, no. 7, pp. 903–916, 1998.
- [116] H. Chen, A. Chédotal, Z. He, C. S. Goodman, and M. Tessier-Lavigne, "Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III," *Neuron*, vol. 19, no. 3, pp. 547–559, 1997.
- [117] Z. He and M. Tessier-Lavigne, "Neuropilin is a receptor for the axonal

- chemorepellent semaphorin III," *Cell*, vol. 90, no. 4, pp. 739–751, 1997.
- [118] T. Takahashi, A. Fournier, F. Nakamura, L. H. Wang, Y. Murakami, R. G. Kalb, H. Fujisawa, and S. M. Strittmatter, "Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors," *Cell*, vol. 99, no. 1, pp. 59–69, 1999.
- [119] V. Castellani, a Chédotal, M. Schachner, C. Faivre-Sarrailh, and G. Rougon, "Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance.," *Neuron*, vol. 27, no. 2, pp. 237–249, 2000.
- [120] A. I. Lyuksyutova, C.-C. Lu, N. Milanesio, L. a King, N. Guo, Y. Wang, J. Nathans, M. Tessier-Lavigne, and Y. Zou, "Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling.," *Science*, vol. 302, no. 5652, pp. 1984–1988, 2003.
- [121] P. C. Salinas and Y. Zou, "Wnt signaling in neural circuit assembly.," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 31, pp. 339–358, 2008.
- [122] F. Trousse, E. Martí, P. Gruss, M. Torres, and P. Bovolenta, "Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog.," *Development*, vol. 128, no. 20, pp. 3927–3936, 2001.
- [123] F. Charron, E. Stein, J. Jeong, A. P. McMahon, and M. Tessier-Lavigne, "The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with Netrin-1 in midline axon guidance," *Cell*, vol. 113, no. 1, pp. 11–23, 2003.
- [124] C. Sánchez-Camacho and P. Bovolenta, "Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons.," *Development*, vol. 135, no. 21, pp. 3531–3541, 2008.
- [125] P. J. Fabre, T. Shimogori, and F. Charron, "Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 1, pp. 266–275, 2010.
- [126] A. Augsburger, A. Schuchardt, S. Hoskins, J. Dodd, and S. Butler, "Bmps as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons," *Neuron*, vol. 24, no. 1, pp. 127–141, 1999.
- [127] K. Yamauchi, K. D. Phan, and S. J. Butler, "BMP type I receptor complexes have distinct activities mediating cell fate and axon guidance decisions.," *Development*, vol. 135, no. 6, pp. 1119–1128, 2008.
- [128] a Colavita, S. Krishna, H. Zheng, R. W. Padgett, and J. G. Culotti, "Pioneer axon guidance by UNC-129, a C. elegans TGF-beta.," *Science*, vol. 281, no. 5377, pp. 706–709, 1998.
- [129] L. T. Macneil, W. R. Hardy, T. Pawson, J. L. Wrana, and J. G. Culotti, "NIH Public

Access,” vol. 12, no. 2, pp. 150–155, 2009.

- [130] A. Ebens, K. Brose, E. D. Leonardo, M. G. H. Jr, F. Bladt, C. Birchmeier, B. a Barres, and M. Tessier-Lavigne, “Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Is an Axonal Chemoattractant and a Neurotrophic Factor for Spinal Motor Neurons,” *Neuron*, vol. 17, no. 6, pp. 1157–1172, 1996.
- [131] R. O’Connor and M. Tessier-Lavigne, “Identification of maxillary factor, a maxillary process-derived chemoattractant for developing trigeminal sensory axons,” *Neuron*, vol. 24, no. 1, pp. 165–178, 1999.
- [132] E. R. Kramer, L. Knott, F. Su, E. Dessaud, C. E. Krull, F. Helmbacher, and R. Klein, “Cooperation between GDNF/Ret and ephrinA/EphA4 Signals for Motor-Axon Pathway Selection in the Limb,” *Neuron*, vol. 50, no. 1, pp. 35–47, 2006.
- [133] G. López-Bendito, A. Cautinat, J. A. Sánchez, F. Bielle, N. Flames, A. N. Garratt, D. a. Talmage, L. W. Role, P. Charnay, O. Marín, and S. Garel, “Tangential Neuronal Migration Controls Axon Guidance: A Role for Neuregulin-1 in Thalamocortical Axon Navigation,” *Cell*, vol. 125, no. 1, pp. 127–142, 2006.
- [134] R. Shirasaki, J. W. Lewcock, K. Lettieri, and S. L. Pfaff, “FGF as a Target-Derived Chemoattractant for Developing Motor Axons Genetically Programmed by the LIM Code,” *Neuron*, vol. 50, no. 6, pp. 841–853, 2006.
- [135] B. B. Gore, K. G. Wong, and M. Tessier-Lavigne, “Stem Cell Factor Functions as an Outgrowth-Promoting Factor to Enable Axon Exit from the Midline Intermediate Target,” *Neuron*, vol. 57, no. 4, pp. 501–510, 2008.
- [136] S. E. Lacy, C. G. Bönnemann, E. a Buzney, and L. M. Kunkel, “Identification of FLRT1, FLRT2, and FLRT3: a novel family of transmembrane leucine-rich repeat proteins,” *Genomics*, vol. 62, no. 3, pp. 417–426, 1999.
- [137] V. A. Jackson, D. del Toro, M. Carrasquero, P. Roversi, K. Harlos, R. Klein, and E. Seiradake, “Structural Basis of Latrophilin-FLRT Interaction,” *Structure*, pp. 1–8, 2015.
- [138] E. E. Karaulanov, R. T. Böttcher, and C. Niehrs, “A role for fibronectin-leucine-rich transmembrane cell-surface proteins in homotypic cell adhesion.,” *EMBO Rep.*, vol. 7, no. 3, pp. 283–290, 2006.
- [139] E. Seiradake, D. del Toro, D. Nagel, F. Cop, R. Härtl, T. Ruff, G. Seyit-Bremer, K. Harlos, E. C. Border, A. Acker-Palmer, E. Y. Jones, and R. Klein, “FLRT Structure: Balancing Repulsion and Cell Adhesion in Cortical and Vascular Development,” *Neuron*, no. Larrive 2007, 2014.
- [140] J. Egea, C. Erlacher, E. Montanez, I. Burtscher, S. Yamagishi, M. Heß, F. Hampel, R. Sanchez, M. T. Rodriguez-Manzaneque, M. R. Bösl, R. Fässler, H. Lickert, and R. Klein, “Genetic ablation of FLRT3 reveals a novel morphogenetic function for

the anterior visceral endoderm in suppressing mesoderm differentiation,” *Genes Dev.*, vol. 22, no. 23, pp. 3349–3362, 2008.

- [141] S. Maretto, P. S. Müller, a. R. Aricescu, K. W. Y. Cho, E. K. Bikoff, and E. J. Robertson, “Ventral closure, headfold fusion and definitive endoderm migration defects in mouse embryos lacking the fibronectin leucine-rich transmembrane protein FLRT3,” *Dev. Biol.*, vol. 318, no. 1, pp. 184–193, 2008.
- [142] S. Ogata, J. Morokuma, T. Hayata, G. Kolle, C. Niehrs, N. Ueno, and K. W. Y. Cho, “TGF- β signaling-mediated morphogenesis: Modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis,” *Genes Dev.*, vol. 21, no. 14, pp. 1817–1831, 2007.
- [143] E. Karaulanov, R. T. Böttcher, P. Stannek, W. Wei, M. Rau, S. Ogata, K. W. Y. Cho, and C. Niehrs, “Unc5B interacts with FLRT3 and Rnd1 to modulate cell adhesion in *Xenopus* embryos,” *PLoS One*, vol. 4, no. 5, pp. 1–9, 2009.
- [144] X. Chen, E. Koh, M. Yoder, and B. M. Gumbiner, “A protocadherin-cadherin-FLRT3 complex controls cell adhesion and morphogenesis,” *PLoS One*, vol. 4, no. 12, 2009.
- [145] Y. Xu, K. Wei, W. Kulyk, and S. G. Gong, “FLRT2 promotes cellular proliferation and inhibits cell adhesion during chondrogenesis,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 112, no. 11, pp. 3440–3448, 2011.
- [146] P.-S. Müller, R. Schulz, S. Maretto, I. Costello, S. Srinivas, E. Bikoff, and E. Robertson, “The fibronectin leucine-rich repeat transmembrane protein Flrt2 is required in the epicardium to promote heart morphogenesis,” *Development*, vol. 138, no. 7, pp. 1297–1308, 2011.
- [147] S. Yamagishi, F. Hampel, K. Hata, D. Del Toro, M. Schwark, E. Kvachnina, M. Bastmeyer, T. Yamashita, V. Tarabykin, R. Klein, and J. Egea, “FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons,” *EMBO J.*, vol. 30, no. 14, pp. 2920–2933, 2011.
- [148] B. P. Haines, L. M. Wheldon, D. Summerbell, J. K. Heath, and P. W. J. Rigby, “Regulated expression of FLRT genes implies a functional role in the regulation of FGF signalling during mouse development,” *Dev. Biol.*, vol. 297, no. 1, pp. 14–25, 2006.
- [149] L. M. Wheldon, B. P. Haines, R. Rajappa, I. Mason, P. W. Rigby, and J. K. Heath, “Critical Role of FLRT1 Phosphorylation in the Interdependent Regulation of FLRT1 Function and FGF Receptor Signalling,” *PLoS One*, vol. 5, no. 4, 2010.
- [150] K. Wei, Y. Xu, H. Tse, M. F. Manolson, and S.-G. Gong, “Mouse FLRT2 Interacts with the Extracellular and Intracellular Regions of FGFR2,” *J. Dent. Res.*, vol. 90, no. 10, pp. 1234–1239, 2011.
- [151] M. Robinson, M. C. Parsons Perez, L. Tébar, J. Palmer, a. Patel, D. Marks, a.

- Sheasby, C. De Felipe, R. Coffin, F. J. Livesey, and S. P. Hunt, "FLRT3 is expressed in sensory neurons after peripheral nerve injury and regulates neurite outgrowth," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 27, no. 2, pp. 202–214, 2004.
- [152] L. Tsuji, T. Yamashita, T. Kubo, T. Madura, H. Tanaka, K. Hosokawa, and M. Tohyama, "FLRT3, a cell surface molecule containing LRR repeats and a FNIII domain, promotes neurite outgrowth," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 313, no. 4, pp. 1086–1091, 2004.
- [153] M. L. O'Sullivan, J. de Wit, J. N. Savas, D. Comoletti, S. Otto-Hitt, J. R. Yates, and A. Ghosh, "FLRT proteins are endogenous latrophilin ligands and regulate excitatory synapse development.," *Neuron*, vol. 73, no. 5, pp. 903–10, Mar. 2012.
- [154] G. J. Bashaw and R. Klein, "Signaling from axon guidance receptors.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, pp. 1–16, 2010.
- [155] J. Q. Zheng and M.-M. Poo, "Calcium signaling in neuronal motility.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, pp. 375–404, 2007.
- [156] T. M. Gomez and J. Q. Zheng, "The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. 2, pp. 115–125, 2006.
- [157] J. Henley and M. M. Poo, "Guiding neuronal growth cones using Ca²⁺ signals," *Trends Cell Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 320–330, 2004.
- [158] J. R. Henley, K. H. Huang, D. Wang, and M. M. Poo, "Calcium mediates bidirectional growth cone turning induced by myelin-associated glycoprotein," *Neuron*, vol. 44, no. 6, pp. 909–916, 2004.
- [159] A. Manuscript, "NIH Public Access," *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [160] H. Song, G. Ming, Z. He, M. Lehmann, L. McKerracher, M. Tessier-Lavigne, and M. Poo, "Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides.," *Science*, vol. 281, no. 5382, pp. 1515–1518, 1998.
- [161] J. R. Terman and A. L. Kolodkin, "Nervy links protein kinase a to plexin-mediated semaphorin repulsion.," *Science*, vol. 303, no. 5661, pp. 1204–1207, 2004.
- [162] J. C. Ayoob, H.-H. Yu, J. R. Terman, and A. L. Kolodkin, "The *Drosophila* receptor guanylyl cyclase Gyc76C is required for semaphorin-1a-plexin A-mediated axonal repulsion.," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 30, pp. 6639–6649, 2004.
- [163] J.-F. Bouchard, S. W. Moore, N. X. Tritsch, P. P. Roux, M. Shekarabi, P. a Barker, and T. E. Kennedy, "Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an intracellular pool: A novel mechanism regulating

- commissural axon extension.," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 12, pp. 3040–3050, 2004.
- [164] S. W. Moore, K. Lai Wing Sun, F. Xie, P. a Barker, M. Conti, and T. E. Kennedy, "Soluble adenylyl cyclase is not required for axon guidance to netrin-1.," *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 15, pp. 3920–3924, 2008.
- [165] S. W. Moore and T. E. Kennedy, "Protein kinase A regulates the sensitivity of spinal commissural axon turning to netrin-1 but does not switch between chemoattraction and chemorepulsion.," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 9, pp. 2419–2423, 2006.
- [166] T. Shigeoka, B. Lu, and C. E. Holt, "RNA-based mechanisms underlying axon guidance," *J. Cell Biol.*, vol. 202, no. 7, pp. 991–999, 2013.
- [167] W. a Harris, C. E. Holt, and F. Bonhoeffer, "Retinal axons with and without their somata, growing to and arborizing in the tectum of *Xenopus* embryos: a time-lapse video study of single fibres in vivo.," *Development*, vol. 101, no. 1, pp. 123–133, 1987.
- [168] D. S. Campbell and C. E. Holt, "Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation," *Neuron*, vol. 32, no. 6, pp. 1013–1026, 2001.
- [169] R. Raman, R. G. Thomas, M. W. Weiner, C. R. Jack, K. Ernstrom, P. S. Aisen, P. N. Tariot, and J. F. Quinn, "NIH Public Access," vol. 23, no. 4, pp. 333–336, 2010.
- [170] D. Colak, S.-J. Ji, B. T. Porse, and S. R. Jaffrey, "Regulation of axon guidance by compartmentalized nonsense-mediated mRNA decay.," *Cell*, vol. 153, no. 6, pp. 1252–65, 2013.
- [171] C. Bouzigues, M. Morel, A. Triller, and M. Dahan, "Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 27, pp. 11251–11256, 2007.
- [172] C. Guirland, S. Suzuki, M. Kojima, B. Lu, and J. Q. Zheng, "Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones," *Neuron*, vol. 42, no. 1, pp. 51–62, 2004.
- [173] A. C. Lin and C. E. Holt, "Local translation and directional steering in axons.," *EMBO J.*, vol. 26, no. 16, pp. 3729–3736, 2007.
- [174] "and Structure Growth of Nerve of Isolated in Culture Sympathetic Neurons," vol. 56, pp. 713–735, 1973.
- [175] V. M. Tennyson, "The fine structure of the axon and growth cone of the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo.," *J. Cell Biol.*, vol. 44, no. 1, pp. 62–79,

1970.

- [176] a Giuditta, W. D. Dettbarn, and M. Brzin, "Protein synthesis in the isolated giant axon of the squid.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 59, no. 4, pp. 1284–1287, 1968.
- [177] E. Koenig and R. Martin, "Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon.," *J. Neurosci.*, vol. 16, no. 4, pp. 1400–1411, 1996.
- [178] G. J. Bassell, H. Zhang, a L. Byrd, a M. Femino, R. H. Singer, K. L. Taneja, L. M. Lifshitz, I. M. Herman, and K. S. Kosik, "Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture.," *J. Neurosci.*, vol. 18, no. 1, pp. 251–265, 1998.
- [179] R. P. C. Manns, G. M. W. Cook, C. E. Holt, and R. J. Keynes, "Differing Semaphorin 3A Concentrations Trigger Distinct Signaling Mechanisms in Growth Cone Collapse," *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 25, pp. 8554–8559, 2012.
- [180] S. Nedelec, M. Peljto, P. Shi, M. W. Amoroso, L. C. Kam, and H. Wichterle, "Concentration-Dependent Requirement for Local Protein Synthesis in Motor Neuron Subtype-Specific Response to Axon Guidance Cues," *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 4, pp. 1496–1506, 2012.
- [181] M. Piper, R. Anderson, A. Dwivedy, C. Weinl, F. Van Horck, K. M. Leung, E. Cogill, and C. Holt, "Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones," *Neuron*, vol. 49, no. 2, pp. 215–228, 2006.
- [182] J. Yao, Y. Sasaki, Z. Wen, G. J. Bassell, and J. Q. Zheng, "An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca²⁺-dependent growth cone guidance.," *Nat. Neurosci.*, vol. 9, no. 10, pp. 1265–1273, 2006.
- [183] K.-M. Leung, F. P. G. van Horck, A. C. Lin, R. Allison, N. Standart, and C. E. Holt, "Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1.," *Nat. Neurosci.*, vol. 9, no. 10, pp. 1247–1256, 2006.
- [184] K. Welshans and G. J. Bassell, "Netrin-1-induced local β -actin synthesis and growth cone guidance requires zipcode binding protein 1.," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 27, pp. 9800–9813, 2011.
- [185] L. N. Antar, C. Li, H. Zhang, R. C. Carroll, and G. J. Bassell, "Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 32, no. 1–2, pp. 37–48, 2006.
- [186] C. Li, G. J. Bassell, and Y. Sasaki, "Fragile X Mental Retardation Protein is Involved in Protein Synthesis-Dependent Collapse of Growth Cones Induced by

- Semaphorin-3A.," *Front. Neural Circuits*, vol. 3, no. September, p. 11, 2009.
- [187] U. Narayanan, V. Nalavadi, M. Nakamoto, G. Thomas, S. Ceman, G. J. Bassell, and S. T. Warren, "S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 27, pp. 18478–18482, 2008.
- [188] A. B. Huber, A. L. Kolodkin, D. D. Ginty, and J.-F. Cloutier, "Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance.," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 26, pp. 509–563, 2003.
- [189] L. Luo, "Rho GTPases in neuronal morphogenesis.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 1, no. 3, pp. 173–180, 2000.
- [190] D. M. Suter and P. Forscher, "Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance," *J. Neurobiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 97–113, 2000.
- [191] M. Negishi and H. Katoh, "Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation," *Tanpakushitsu Kakusan Koso.*, vol. 49, no. 3 Suppl, pp. 331–336, 2004.
- [192] E. Govek, S. E. Newey, and L. Van Aelst, "The role of the Rho GTPases in neuronal development The role of the Rho GTPases in neuronal development," *Genes Dev.*, vol. 19, pp. 1–49, 2005.
- [193] T. Wittmann and C. M. Waterman-Storer, "Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way?," *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. Pt 21, pp. 3795–3803, 2001.
- [194] H. Daub, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, A. Sobel, and A. Hall, "Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 3, pp. 1677–1680, 2001.
- [195] A. Hall and G. Lalli, "Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 1–18, 2010.
- [196] K. Keleman, S. Rajagopalan, D. Cleppien, D. Teis, K. Paiha, L. a. Huber, G. M. Technau, and B. J. Dickson, "Comm sorts Robo to control axon guidance at the Drosophila midline," *Cell*, vol. 110, no. 4, pp. 415–427, 2002.
- [197] S. W. Moore, J. P. Correia, K. Lai Wing Sun, M. Pool, A. E. Fournier, and T. E. Kennedy, "Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1.," *Development*, vol. 135, no. 17, pp. 2855–2864, 2008.

- [198] C. W. Cowan, Y. R. Shao, M. Sahin, S. M. Shamah, M. Z. Lin, P. L. Greer, S. Gao, E. C. Griffith, J. S. Brugge, and M. E. Greenberg, "Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance," *Neuron*, vol. 46, no. 2, pp. 205–217, 2005.
- [199] M. E. Williams, S. C.-Y. Wu, W. L. McKenna, and L. Hinck, "Surface expression of the netrin receptor UNC5H1 is regulated through a protein kinase C-interacting protein/protein kinase-dependent mechanism.," *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 36, pp. 11279–11288, 2003.
- [200] J. L. Bartoe, W. L. McKenna, T. K. Quan, B. K. Stafford, J. a Moore, J. Xia, K. Takamiya, R. L. Huganir, and L. Hinck, "Protein interacting with C-kinase 1/protein kinase Calpha-mediated endocytosis converts netrin-1-mediated repulsion to attraction.," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 12, pp. 3192–3205, 2006.
- [201] W. L. McKenna, C. Wong-Staal, G. C. Kim, H. Macias, L. Hinck, and J. L. Bartoe, "Netrin-1-independent adenosine A2b receptor activation regulates the response of axons to netrin-1 by controlling cell surface levels of UNC5A receptors," *J. Neurochem.*, vol. 104, no. 4, pp. 1081–1090, 2008.
- [202] a Krystosek and N. W. Seeds, "Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 12, pp. 7810–7814, 1981.
- [203] Y. Y. Chen, C. L. Hehr, K. Atkinson-Leadbetter, J. C. Hocking, and S. McFarlane, "Targeting of retinal axons requires the metalloproteinase ADAM10.," *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 31, pp. 8448–8456, 2007.
- [204] C. L. Hehr, J. C. Hocking, and S. McFarlane, "Matrix metalloproteinases are required for retinal ganglion cell axon guidance at select decision points.," *Development*, vol. 132, no. 15, pp. 3371–3379, 2005.
- [205] M. J. Galko and M. Tessier-Lavigne, "Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity.," *Science*, vol. 289, no. 5483, pp. 1365–1367, 2000.
- [206] M. Hattori, M. Osterfield, and J. G. Flanagan, "Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent.," *Science*, vol. 289, no. 5483, pp. 1360–1365, 2000.
- [207] P. W. Janes, N. Saha, W. a. Barton, M. V. Kolev, S. H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C. P. Blobel, J. P. Himanen, M. Lackmann, and D. B. Nikolov, "Adam meets Eph: An ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans," *Cell*, vol. 123, no. 2, pp. 291–304, 2005.
- [208] K. T. Lin, S. Sloniewski, D. W. Ethell, and I. M. Ethell, "Ephrin-B2-induced cleavage of EphB2 receptor is mediated by matrix metalloproteinases to trigger cell repulsion," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 43, pp. 28969–28979, 2008.

- [209] K. Schimmelpfeng, S. Gögel, and C. Klämbt, "The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration," *Mech. Dev.*, vol. 106, no. 1–2, pp. 25–36, 2001.
- [210] H. a Coleman, J.-P. Labrador, R. K. Chance, and G. J. Bashaw, "The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline.," *Development*, vol. 137, no. 14, pp. 2417–2426, 2010.
- [211] P. Dujia and G. M. Rubin, "Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis," *Cell*, vol. 90, no. 2, pp. 271–280, 1997.
- [212] J. S. Mumm, E. H. Schroeter, M. T. Saxena, a Griesemer, X. Tian, D. J. Pan, W. J. Ray, and R. Kopan, "A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1.," *Mol. Cell*, vol. 5, no. 2, pp. 197–206, 2000.
- [213] D. J. Selkoe and M. S. Wolfe, "Presenilin: Running with Scissors in the Membrane," *Cell*, vol. 131, no. 2, pp. 215–221, 2007.
- [214] I. Dudanova and R. Klein, "Integration of guidance cues: Parallel signaling and crosstalk," *Trends Neurosci.*, vol. 36, no. 5, pp. 295–304, 2013.
- [215] B. J. Dickson and Y. Zou, "Navigating intermediate targets: the nervous system midline.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 8, pp. 1–17, 2010.
- [216] A. Chédotal, "Further tales of the midline," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 68–75, 2011.
- [217] C. Ruiz de Almodovar, P. J. Fabre, E. Knevels, C. Coulon, I. Segura, P. C. G. Haddick, L. Aerts, N. Delattin, G. Strasser, W. J. Oh, C. Lange, S. Vinckier, J. Haigh, C. Fouquet, C. Gu, K. Alitalo, V. Castellani, M. Tessier-Lavigne, A. Chedotal, F. Charron, and P. Carmeliet, "VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1," *Neuron*, vol. 70, no. 5, pp. 966–978, 2011.
- [218] T. Serafini, S. a. Colamarino, E. D. Leonardo, H. Wang, R. Beddington, W. C. Skarnes, and M. Tessier-Lavigne, "Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system," *Cell*, vol. 87, no. 6, pp. 1001–1014, 1996.
- [219] E. Stein and M. Tessier-Lavigne, "Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex.," *Science*, vol. 291, no. 5510, pp. 1928–1938, 2001.
- [220] I. Dudanova, G. Gatto, and R. Klein, "GDNF acts as a chemoattractant to support ephrina-induced repulsion of limb motor axons," *Curr. Biol.*, vol. 20, no. 23, pp.

2150–2156, 2010.

- [221] D. Bonanomi, O. Chivatakarn, G. Bai, H. Abdessellem, K. Lettieri, T. Marquardt, B. a. Pierchala, and S. L. Pfaff, “Ret is a multifunctional coreceptor that integrates diffusible- and contact-axon guidance signals,” *Cell*, vol. 148, no. 3, pp. 568–582, 2012.
- [222] I. Dudanova, T.-J. Kao, J. E. Herrmann, B. Zheng, a. Kania, and R. Klein, “Genetic Evidence for a Contribution of EphA:EphrinA Reverse Signaling to Motor Axon Guidance,” *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 15, pp. 5209–5215, 2012.
- [223] F. Bielle, P. Marcos-Mondéjar, E. Leyva-Díaz, L. Lokmane, E. Mire, C. Mailhes, M. Keita, N. García, M. Tessier-Lavigne, S. Garel, and G. López-Bendito, “Emergent growth cone responses to combinations of Slit1 and Netrin 1 in thalamocortical axon topography,” *Curr. Biol.*, vol. 21, no. 20, pp. 1748–1755, 2011.
- [224] E. Leyva-Díaz and G. López-Bendito, “In and out from the cortex: Development of major forebrain connections,” *Neuroscience*, vol. 254, pp. 26–44, 2013.
- [225] B. G. Rash and L. J. Richards, “A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 434, no. 2, pp. 147–157, 2001.
- [226] R. M. Fame, J. L. MacDonald, and J. D. Macklis, “Development, specification, and diversity of callosal projection neurons,” *Trends Neurosci.*, vol. 34, no. 1, pp. 41–50, 2011.
- [227] A.-L. S. Donahoo and L. J. Richards, “Understanding the mechanisms of callosal development through the use of transgenic mouse models,” *Semin. Pediatr. Neurol.*, vol. 16, no. 3, pp. 127–142, 2009.
- [228] C. Lindwall, T. Fothergill, and L. J. Richards, “Commissure formation in the mammalian forebrain,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 17, no. 1, pp. 3–14, 2007.
- [229] S. E. Koester and D. D. O’Leary, “Axons of early generated neurons in cingulate cortex pioneer the corpus callosum,” *J. Neurosci.*, vol. 14, no. 11 Pt 1, pp. 6608–6620, 1994.
- [230] B. D. Mitchell and J. D. Macklis, “Large-scale maintenance of dual projections by callosal and frontal cortical projection neurons in adult mice,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 482, no. 1, pp. 17–32, 2005.
- [231] L. J. Richards, C. Plachez, and T. Ren, “Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human,” *Clin. Genet.*, vol. 66, no. 4, pp. 276–289, 2004.
- [232] B. J. Molyneaux, P. Arlotta, R. M. Fame, J. L. MacDonald, K. L. MacQuarrie, and J. D. Macklis, “Novel subtype-specific genes identify distinct subpopulations of

- callosal projection neurons.," *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 39, pp. 12343–12354, 2009.
- [233] F. Polleux, R. J. Giger, D. D. Ginty, a L. Kolodkin, and a Ghosh, "Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions.," *Science*, vol. 282, no. 5395, pp. 1904–1906, 1998.
- [234] H. Zhao, T. Maruyama, Y. Hattori, N. Sugo, H. Takamatsu, A. Kumanogoh, R. Shirasaki, and N. Yamamoto, "A molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons in the developing neocortex," *J. Comp. Neurol.*, vol. 519, no. 5, pp. 834–848, 2011.
- [235] M. Niquille, S. Garel, F. Mann, J. P. Hornung, B. Otsmane, S. Chevalley, C. Parras, F. Guillemot, P. Gaspar, Y. Yanagawa, and C. Lebrand, "Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: A role for semaphorin 3C," *PLoS Biol.*, vol. 7, no. 10, 2009.
- [236] S. W. Mendes, M. Henkemeyer, and D. J. Liebl, "Multiple Eph receptors and B-class ephrins regulate midline crossing of corpus callosum fibers in the developing mouse forebrain.," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 3, pp. 882–892, 2006.
- [237] T. Shu and L. J. Richards, "Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum.," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 8, pp. 2749–2758, 2001.
- [238] A. Bagri, O. Marín, A. S. Plump, J. Mak, S. J. Pleasure, J. L. R. Rubenstein, and M. Tessier-Lavigne, "Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain," *Neuron*, vol. 33, no. 2, pp. 233–248, 2002.
- [239] T. Shu, V. Sundaresan, M. M. McCarthy, and L. J. Richards, "Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline in vivo.," *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 22, pp. 8176–8184, 2003.
- [240] T. R. Keeble, M. M. Halford, C. Seaman, N. Kee, M. Macheda, R. B. Anderson, S. a Stackler, and H. M. Cooper, "The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum.," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 21, pp. 5840–5848, 2006.
- [241] G. López-Bendito, N. Flames, L. Ma, C. Fouquet, T. Di Meglio, A. Chedotal, M. Tessier-Lavigne, and O. Marín, "Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain.," *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 13, pp. 3395–3407, 2007.
- [242] S. M. Islam, Y. Shinmyo, T. Okafuji, Y. Su, I. Bin Naser, G. Ahmed, S. Zhang, S. Chen, K. Ohta, H. Kiyonari, T. Abe, S. Tanaka, R. Nishinakamura, T. Terashima, T. Kitamura, and H. Tanaka, "Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord

- and forebrain commissures.," *Science*, vol. 323, no. 5912, pp. 388–393, 2009.
- [243] M. Piper, C. Plachez, O. Zalucki, T. Fothergill, G. Goudreau, R. Erzurumlu, C. Gu, and L. J. Richards, "Neuropilin 1-sema signaling regulates crossing of cingulate pioneering axons during development of the corpus callosum," *Cereb. Cortex*, vol. 19, no. SUPPL. 1, pp. 11–21, 2009.
- [244] T. Fothergill, A. L. S. Donahoo, A. Douglass, O. Zalucki, J. Yuan, T. Shu, G. J. Goodhill, and L. J. Richards, "Netrin-DCC signaling regulates corpus callosum formation through attraction of pioneering axons and by modulating slit2-mediated repulsion," *Cereb. Cortex*, vol. 24, no. 5, pp. 1138–1151, 2014.
- [245] C. Gu, E. R. Rodriguez, D. V. Reimert, T. Shu, B. Fritzsche, L. J. Richards, A. L. Kolodkin, and D. D. Ginty, "Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development," *Dev. Cell*, vol. 5, no. 1, pp. 45–57, 2003.
- [246] Y. Hatanaka, T. Matsumoto, Y. Yanagawa, H. Fujisawa, F. Murakami, and M. Masu, "Distinct roles of neuropilin 1 signaling for radial and tangential extension of callosal axons," *J. Comp. Neurol.*, vol. 514, no. 3, pp. 215–225, 2009.
- [247] H. S. Ozaki and D. Wahlsten, "Timing and origin of the first cortical axons to project through the corpus callosum and the subsequent emergence of callosal projection cells in mouse," *J. Comp. Neurol.*, vol. 400, no. 2, pp. 197–206, 1998.
- [248] C. R. Norris and K. Kalil, "Guidance of callosal axons by radial glia in the developing cerebral cortex," *J. Neurosci.*, vol. 11, no. 11, pp. 3481–3492, 1991.
- [249] T. Terashima, "Anatomy, development and lesion-induced plasticity of rodent corticospinal tract.," *Neurosci. Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 139–161, 1995.
- [250] S. Gianino, S. a. Stein, H. Li, X. Lu, E. Biesiada, J. Ulas, and X. M. Xu, "Postnatal growth of corticospinal axons in the spinal cord of developing mice," *Dev. Brain Res.*, vol. 112, no. 2, pp. 189–204, 1999.
- [251] C. Brösamle and M. E. Schwab, "Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract," *J. Comp. Neurol.*, vol. 386, no. 2, pp. 293–303, 1997.
- [252] A. E. Rünker, G. E. Little, F. Suto, H. Fujisawa, and K. J. Mitchell, "Semaphorin-6A controls guidance of corticospinal tract axons at multiple choice points.," *Neural Dev.*, vol. 3, no. December, p. 34, 2008.
- [253] D. Bagnard, M. Lohrum, D. Uziel, a W. Püschel, and J. Bolz, "Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections.," *Development*, vol. 125, no. 24, pp. 5043–5053, 1998.
- [254] C. Métin, D. Deléglise, T. Serafini, T. E. Kennedy, and M. Tessier-Lavigne, "A role

- for netrin-1 in the guidance of cortical efferents.," *Development*, vol. 124, no. 24, pp. 5063–5074, 1997.
- [255] L. J. Richards, S. E. Koester, R. Tuttle, and D. D. O'Leary, "Directed growth of early cortical axons is influenced by a chemoattractant released from an intermediate target.," *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 7, pp. 2445–2458, 1997.
- [256] "On-the-development-of-the-pyramidal-tract-in-the-rat." .
- [257] J. H. Finger, R. T. Bronson, B. Harris, K. Johnson, S. a Przyborski, and S. L. Ackerman, "The netrin 1 receptors Unc5h3 and Dcc are necessary at multiple choice points for the guidance of corticospinal tract axons.," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 23, pp. 10346–10356, 2002.
- [258] S. Cohen and M. E. Greenberg, "Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 24, pp. 183–209, 2008.
- [259] B. Rolf, M. Bastmeyer, M. Schachner, and U. Bartsch, "Pathfinding errors of corticospinal axons in neural cell adhesion molecule-deficient mice.," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 19, pp. 8357–8362, 2002.
- [260] a. J. Canty and M. Murphy, "Molecular mechanisms of axon guidance in the developing corticospinal tract," *Prog. Neurobiol.*, vol. 85, no. 2, pp. 214–235, 2008.
- [261] R. L. Faulkner, L. K. Low, X.-B. Liu, J. Coble, E. G. Jones, and H.-J. Cheng, "Dorsal turning of motor corticospinal axons at the pyramidal decussation requires plexin signaling.," *Neural Dev.*, vol. 3, p. 21, 2008.
- [262] M. Dottori, L. Hartley, M. Galea, G. Paxinos, M. Polizzotto, T. Kilpatrick, P. F. Bartlett, M. Murphy, F. Köntgen, and a W. Boyd, "EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 22, pp. 13248–13253, 1998.
- [263] J. R. Coonan, U. Greferath, J. Messenger, L. Hartley, M. Murphy, A. W. Boyd, M. Dottori, M. P. Galea, and P. F. Bartlett, "Development and reorganization of corticospinal projections in EphA4 deficient mice," *J. Comp. Neurol.*, vol. 436, no. 2, pp. 248–262, 2001.
- [264] K. Kullander, S. D. Croll, M. Zimmer, L. Pan, J. McClain, V. Hughes, S. Zabski, T. M. DeChiara, R. Klein, G. D. Yancopoulos, and N. W. Gale, "Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 7, pp. 877–888, 2001.
- [265] K. Kullander, N. K. Mather, F. Diella, M. Dottori, A. W. Boyd, and R. Klein, "Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in

- major axon tract formation in vivo," *Neuron*, vol. 29, no. 1, pp. 73–84, 2001.
- [266] N. Yokoyama, M. I. Romero, C. a. Cowan, P. Galvan, F. Helmbacher, P. Charnay, L. F. Parada, and M. Henkemeyer, "Forward signaling mediated by ephrin-B3 prevents contralateral corticospinal axons from recrossing the spinal cord midline," *Neuron*, vol. 29, no. 1, pp. 85–97, 2001.
- [267] S. M. Sherman and R. W. Guillery, "On the actions that one nerve cell can have on another: distinguishing 'drivers' from 'modulators' .," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 12, pp. 7121–7126, 1998.
- [268] B. Miller, L. Chou, and B. L. Finlay, "The early development of thalamocortical and corticothalamic projections.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 335, no. 1, pp. 16–41, 1993.
- [269] D. J. Price, H. Kennedy, C. Dehay, L. Zhou, M. Mercier, Y. Jossin, A. M. Goffinet, F. Tissir, D. Blakey, and Z. Molnár, "The development of cortical connections," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 23, no. 4, pp. 910–920, 2006.
- [270] B. J. Molyneaux, P. Arlotta, J. R. L. Menezes, and J. D. Macklis, "Neuronal subtype specification in the cerebral cortex.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, no. June, pp. 427–437, 2007.
- [271] E. G. Jones, "Thalamic circuitry and thalamocortical synchrony.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 357, no. 1428, pp. 1659–1673, 2002.
- [272] S. M. Sherman and R. W. Guillery, "The role of the thalamus in the flow of information to the cortex.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 357, no. 1428, pp. 1695–1708, 2002.
- [273] S. J. Cruikshank, H. Urabe, A. V. Nurmikko, and B. W. Connors, "Pathway-Specific Feedforward Circuits between Thalamus and Neocortex Revealed by Selective Optical Stimulation of Axons," *Neuron*, vol. 65, no. 2, pp. 230–245, 2010.
- [274] E. Grant, A. Hoerder-Suabedissen, and Z. Molnár, "Development of the corticothalamic projections," *Front. Neurosci.*, vol. 6, no. May, pp. 1–14, 2012.
- [275] T. Lickiss, A. F. P. Cheung, C. E. Hutchinson, J. S. H. Taylor, and Z. Molnár, "Examining the relationship between early axon growth and transcription factor expression in the developing cerebral cortex," *J. Anat.*, vol. 220, no. 3, pp. 201–211, 2012.
- [276] D. Bagnard, N. Chounlamountri, a W. Püschel, and J. Bolz, "Axonal surface molecules act in combination with semaphorin 3a during the establishment of corticothalamic projections.," *Cereb. Cortex*, vol. 11, no. 3, pp. 278–285, 2001.
- [277] I. Skaliora, W. Singer, H. Betz, and a W. Püschel, "Differential patterns of semaphorin expression in the developing rat brain.," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 10,

no. 4, pp. 1215–1229, 1998.

- [278] R. L. M. Lett, W. Wang, and T. P. O'Connor, "Semaphorin 5B is a novel inhibitory cue for corticofugal axons," *Cereb. Cortex*, vol. 19, no. 6, pp. 1408–1421, 2009.
- [279] D. Bagnard, N. Thomasset, M. Lohrum, a W. Püschel, and J. Bolz, "Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones.," *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 3, pp. 1030–1035, 2000.
- [280] E. C. Jacobs, C. Campagnoni, K. Kampf, S. D. Reyes, V. Kalra, V. Handley, Y. Y. Xie, Y. Hong-Hu, V. Spreur, R. S. Fisher, and A. T. Campagnoni, "Visualization of corticofugal projections during early cortical development in a ??-GFP-transgenic mouse," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 25, no. 1, pp. 17–30, 2007.
- [281] J. a De Carlos and D. D. O'Leary, "Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways," *J. Neurosci.*, vol. 12, no. 4, pp. 1194–1211, 1992.
- [282] Z. Molnár and P. Cordery, "Connections between cells of the internal capsule, thalamus, and cerebral cortex in embryonic rat," *J. Comp. Neurol.*, vol. 413, no. 1, pp. 1–25, 1999.
- [283] a Agmon, L. T. Yang, E. G. Jones, and D. K. O'Dowd, "Topological precision in the thalamic projection to neonatal mouse barrel cortex," *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 1 Pt 2, pp. 549–561, 1995.
- [284] F. M. Oeschger, W. Z. Wang, S. Lee, F. García-Moreno, A. M. Goffinet, M. L. Arbonés, S. Rakic, and Z. Molnár, "Gene expression analysis of the embryonic subplate," *Cereb. Cortex*, vol. 22, no. 6, pp. 1343–1359, 2012.
- [285] J. E. Braisted, T. Ringstedt, and D. D. M. O'Leary, "Slits are chemorepellents endogenous to hypothalamus and steer thalamocortical axons into ventral telencephalon," *Cereb. Cortex*, vol. 19, no. SUPPL. 1, 2009.
- [286] Z. Molnár, R. Adams, and C. Blakemore, "Mechanisms underlying the early establishment of thalamocortical connections in the rat.," *J. Neurosci.*, vol. 18, no. 15, pp. 5723–5745, 1998.
- [287] S. Horng, G. Kreiman, C. Ellsworth, D. Page, M. Blank, K. Millen, and M. Sur, "Differential gene expression in the developing lateral geniculate nucleus and medial geniculate nucleus reveals novel roles for Zic4 and Foxp2 in visual and auditory pathway development.," *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 43, pp. 13672–13683, 2009.
- [288] W. Andrews, A. Liapi, C. Plachez, L. Camurri, J. Zhang, S. Mori, F. Murakami, J. G. Parnavelas, V. Sundaresan, and L. J. Richards, "Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain.,"

Development, vol. 133, no. 11, pp. 2243–2252, 2006.

- [289] E. Mire, C. Mezzera, E. Leyva-Díaz, A. V Paternain, P. Squarzoni, L. Bluy, M. Castillo-Paterna, M. J. López, S. Peregrín, M. Tessier-Lavigne, S. Garel, J. Galcerán, J. Lerma, and G. López-Bendito, “Spontaneous activity regulates Robo1 transcription to mediate a switch in thalamocortical axon growth,” *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 8, pp. 1134–1143, 2012.
- [290] M. Deck, L. Lokmane, S. Chauvet, C. Mailhes, M. Keita, M. Niquille, M. Yoshida, Y. Yoshida, C. Lebrand, F. Mann, E. a Grove, and S. Garel, “Pathfinding of corticothalamic axons relies on a rendezvous with thalamic projections.,” *Neuron*, vol. 77, no. 3, pp. 472–84, Feb. 2013.
- [291] Z. Molnár, S. Garel, G. López-Bendito, P. Maness, and D. J. Price, “Mechanisms controlling the guidance of thalamocortical axons through the embryonic forebrain.,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 35, no. 10, pp. 1573–85, May 2012.
- [292] G. López-Bendito and Z. Molnár, “Thalamocortical development: how are we going to get there?,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 4, no. 4, pp. 276–89, Apr. 2003.
- [293] S. Garel and J. L. R. Rubenstein, “Intermediate targets in formation of topographic projections: Inputs from the thalamocortical system,” *Trends Neurosci.*, vol. 27, no. 9, pp. 533–539, 2004.
- [294] C. J. Shatz and M. B. Luskin, “The relationship between the geniculocortical afferents and their cortical target cells during development of the cat’s primary visual cortex.,” *J. Neurosci.*, vol. 6, no. 12, pp. 3655–3668, 1986.
- [295] E. Mire, C. Mezzera, E. Leyva-Díaz, A. V Paternain, P. Squarzoni, L. Bluy, M. Castillo-Paterna, M. J. López, S. Peregrín, M. Tessier-Lavigne, S. Garel, J. Galcerán, J. Lerma, and G. López-Bendito, “Spontaneous activity regulates Robo1 transcription to mediate a switch in thalamocortical axon growth,” *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 8, pp. 1134–1143, 2012.
- [296] Z. Molnár and C. Blakemore, “How do thalamic the cortex ?,” *Development*, vol. 18, no. 9, pp. 389–397, 1995.
- [297] Z. Molnár, R. Adams, a M. Goffinet, and C. Blakemore, “The role of the first postmitotic cortical cells in the development of thalamocortical innervation in the reeler mouse.,” *J. Neurosci.*, vol. 18, no. 15, pp. 5746–5765, 1998.
- [298] a R. Bicknese, a M. Sheppard, D. D. O’Leary, and a L. Pearlman, “Thalamocortical axons extend along a chondroitin sulfate proteoglycan-enriched pathway coincident with the neocortical subplate and distinct from the efferent path.,” *J. Neurosci.*, vol. 14, no. 6, pp. 3500–3510, 1994.
- [299] R. S. E. Carney, L. a. Cocas, T. Hirata, K. Mansfield, and J. G. Corbin, “Differential regulation of telencephalic pallial-subpallial boundary Patterning by Pax6 and

- Gsh2," *Cereb. Cortex*, vol. 19, no. 4, pp. 745–759, 2009.
- [300] P. Chapouton, C. Schuurmans, F. Guillemot, and M. Götz, "The transcription factor neurogenin 2 restricts cell migration from the cortex to the striatum.," *Development*, vol. 128, no. 24, pp. 5149–5159, 2001.
- [301] R. S. E. Carney, T. B. Alfonso, D. Cohen, H. Dai, S. Nery, B. Stoica, J. Slotkin, B. S. Bregman, G. Fishell, and J. G. Corbin, "Cell migration along the lateral cortical stream to the developing basal telencephalic limbic system.," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 45, pp. 11562–11574, 2006.
- [302] Z. Molnár and A. B. Butler, "The corticostriatal junction: A crucial region for forebrain development and evolution," *BioEssays*, vol. 24, no. 6, pp. 530–541, 2002.
- [303] Y. Chen, D. Magnani, T. Theil, T. Pratt, and D. J. Price, "Evidence that descending cortical axons are essential for thalamocortical axons to cross the pallial-subpallial boundary in the embryonic forebrain," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, 2012.
- [304] K. Mandai, D. V. Reimert, and D. D. Ginty, "Linx mediates interaxonal interactions and formation of the internal capsule," *Neuron*, vol. 83, no. 1, pp. 93–103, 2014.
- [305] P. Vanderhaeghen and F. Polleux, "Developmental mechanisms patterning thalamocortical projections: Intrinsic, extrinsic and in between," *Trends Neurosci.*, vol. 27, no. 7, pp. 384–391, 2004.
- [306] I. Frappé, a Gaillard, and M. Roger, "Attraction exerted in vivo by grafts of embryonic neocortex on developing thalamic axons.," *Exp. Neurol.*, vol. 169, no. 2, pp. 264–275, 2001.
- [307] I. Frappé, M. Roger, and a. Gaillard, "Transplants of fetal frontal cortex grafted into the occipital cortex of newborn rats receive a substantial thalamic input from nuclei normally projecting to the frontal cortex," *Neuroscience*, vol. 89, no. 2, pp. 409–421, 1999.
- [308] S. Garel, K. Yun, R. Grosschedl, and J. L. R. Rubenstein, "The early topography of thalamocortical projections is shifted in Ebf1 and Dlx1/2 mutant mice.," *Development*, vol. 129, no. 24, pp. 5621–5634, 2002.
- [309] S. Garel, K. J. Huffman, and J. L. R. Rubenstein, "Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in Fgf8 hypomorphic mutants.," *Development*, vol. 130, no. 9, pp. 1903–1914, 2003.
- [310] A. Dufour, J. Seibt, L. Passante, V. Depaepe, T. Ciossek, J. Frisé, K. Kullander, J. G. Flanagan, F. Polleux, and P. Vanderhaeghen, "Area specificity and topography of thalamocortical projections are controlled by ephrin/Eph genes," *Neuron*, vol.

39, no. 3, pp. 453–465, 2003.

- [311] F. Bielle, P. Marcos-Mondejar, M. Keita, C. Mailhes, C. Verney, K. Nguyen Ba-Charvet, M. Tessier-Lavigne, G. Lopez-Bendito, and S. Garel, “Slit2 activity in the migration of guidepost neurons shapes thalamic projections during development and evolution,” *Neuron*, vol. 69, no. 6, pp. 1085–1098, 2011.
- [312] J. E. Braisted, R. Tuttle, and D. D. O’leary, “Thalamocortical axons are influenced by chemorepellent and chemoattractant activities localized to decision points along their path.,” *Dev. Biol.*, vol. 208, no. 2, pp. 430–440, 1999.
- [313] C. Métin and P. Godement, “The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons.,” *J. Neurosci.*, vol. 16, no. 10, pp. 3219–3235, 1996.
- [314] J. E. Braisted, S. M. Catalano, R. Stimac, T. E. Kennedy, M. Tessier-Lavigne, C. J. Shatz, and D. D. O’Leary, “Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection.,” *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 15, pp. 5792–5801, 2000.
- [315] P. a Leighton, K. J. Mitchell, L. V Goodrich, X. Lu, K. Pinson, P. Scherz, W. C. Skarnes, and M. Tessier-Lavigne, “Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice.,” *Nature*, vol. 410, no. 6825, pp. 174–179, 2001.
- [316] A. W. Powell, T. Sassa, Y. Wu, M. Tessier-Lavigne, and F. Polleux, “Topography of thalamic projections requires attractive and repulsive functions of netrin-1 in the ventral telencephalon,” *PLoS Biol.*, vol. 6, no. 5, pp. 1047–1068, 2008.
- [317] G. E. Little, G. López-Bendito, A. E. Rünker, N. García, M. C. Piñon, A. Chédotal, Z. Molnár, and K. J. Mitchell, “Specificity and plasticity of thalamocortical connections in Sema6A mutant mice,” *PLoS Biol.*, vol. 7, no. 4, pp. 0756–0770, 2009.
- [318] J. Egea, U. V. Nissen, A. Dufour, M. Sahin, P. Greer, K. Kullander, T. D. Mrsic-Flogel, M. E. Greenberg, O. Kiehn, P. Vanderhaeghen, and R. Klein, “Regulation of EphA4 kinase activity is required for a subset of axon guidance decisions suggesting a key role for receptor clustering in Eph function,” *Neuron*, vol. 47, no. 4, pp. 515–528, 2005.
- [319] M. Torii and P. Levitt, “Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism,” *Neuron*, vol. 48, no. 4, pp. 563–575, 2005.
- [320] R. J. Pasterkamp and R. J. Giger, “Semaphorin function in neural plasticity and disease,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 19, no. 3, pp. 263–274, 2009.
- [321] A. G. Wright, G. P. Demyanenko, A. Powell, M. Schachner, L. Enriquez-Barreto, T.

- S. Tran, F. Polleux, and P. F. Maness, "Close homolog of L1 and neuropilin 1 mediate guidance of thalamocortical axons at the ventral telencephalon.," *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 50, pp. 13667–13679, 2007.
- [322] G. P. Demyanenko, T. T. Riday, T. S. Tran, J. Dalal, E. P. Darnell, L. H. Brenneman, T. Sakurai, M. Grumet, B. D. Philpot, and P. F. Maness, "NrCAM deletion causes topographic mistargeting of thalamocortical axons to the visual cortex and disrupts visual acuity.," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 4, pp. 1545–1558, 2011.
- [323] B. G. Rash and E. a. Grove, "Area and layer patterning in the developing cerebral cortex," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 16, no. 1, pp. 25–34, 2006.
- [324] D. D. O'Leary and S. Sahara, "Genetic regulation of arealization of the neocortex," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 18, no. 1, pp. 90–100, 2008.
- [325] L. Xue, J.-Y. Cai, J. Ma, Z. Huang, M.-X. Guo, L.-Z. Fu, Y.-B. Shi, and W.-X. Li, "Global expression profiling reveals genetic programs underlying the developmental divergence between mouse and human embryogenesis.," *BMC Genomics*, vol. 14, no. 1, p. 568, 2013.
- [326] M. Barber, T. Di Meglio, W. D. Andrews, L. R. Hernández-Miranda, F. Murakami, A. Chédotal, and J. G. Parnavelas, "The role of Robo3 in the development of cortical interneurons," *Cereb. Cortex*, vol. 19, no. SUPPL. 1, 2009.
- [327] Y. Gonda, W. D. Andrews, H. Tabata, T. Namba, J. G. Parnavelas, K. Nakajima, S. Kohsaka, C. Hanashima, and S. Uchino, "Robo1 regulates the migration and laminar distribution of upper-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex," *Cereb. Cortex*, vol. 23, no. 6, pp. 1495–1508, 2013.
- [328] L. R. Hernández-Miranda, A. Cariboni, C. Faux, C. Ruhrberg, J. H. Cho, J.-F. Cloutier, B. J. Eickholt, J. G. Parnavelas, and W. D. Andrews, "Robo1 regulates semaphorin signaling to guide the migration of cortical interneurons through the ventral forebrain.," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 16, pp. 6174–6187, 2011.
- [329] V. Borrell, A. Cárdenas, G. Ciceri, J. Galcerán, N. Flames, R. Pla, S. Nóbrega-Pereira, C. García-Frigola, S. Peregrín, Z. Zhao, L. Ma, M. Tessier-Lavigne, and O. Marín, "Slit/Robo Signaling Modulates the Proliferation of Central Nervous System Progenitors," *Neuron*, vol. 76, no. 2, pp. 338–352, 2012.
- [330] A. Jaworski, H. Long, and M. Tessier-Lavigne, "Collaborative and specialized functions of Robo1 and Robo2 in spinal commissural axon guidance.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 28, pp. 9445–9453, 2010.
- [331] M. Seki, A. Watanabe, S. Enomoto, T. Kawamura, H. Ito, T. Kodama, T. Hamakubo, and H. Aburatani, "Human ROBO1 is cleaved by metalloproteinases and γ -secretase and migrates to the nucleus in cancer cells," *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 13, pp. 2909–2915, 2010.

- [332] H. Ito, S. I. Funahashi, N. Yamauchi, J. Shibahara, Y. Midorikawa, S. Kawai, Y. Kinoshita, A. Watanabe, Y. Hippo, T. Ohtomo, H. Iwanari, A. Nakajima, M. Makuuchi, M. Fukayama, Y. Hirata, T. Hamakubo, T. Kodama, M. Tsuchiya, and H. Aburatani, "Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 11 I, pp. 3257–3264, 2006.
- [333] R. Barak, R. Lahmi, L. Gevorkyan-Airapetov, E. Levy, A. Tzur, and Y. Opatowsky, "Crystal structure of the extracellular juxtamembrane region of Robo1," *J. Struct. Biol.*, vol. 186, no. 2, pp. 283–291, 2014.
- [334] E. Leyva-Díaz, D. del Toro, M. J. Menal, S. Cambray, R. Susín, M. Tessier-Lavigne, R. Klein, J. Egea, and G. López-Bendito, "FLRT3 is a Robo1-interacting protein that determines Netrin-1 attraction in developing axons," *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 494–508, Mar. 2014.
- [335] M. X. G. Shao, I. F. Ueki, and J. a Nadel, "Tumor necrosis factor α -converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 20, pp. 11618–11623, 2003.
- [336] U. M. Moll, G. L. Youngleib, K. B. Rosinski, and J. P. Quigley, "Tumor promoter-stimulated Mr 92,000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells: Isolation and characterization of the enzyme from HT1080 tumor cells," *Cancer Res.*, vol. 50, no. 19, pp. 6162–6170, 1990.
- [337] U. Sahin, G. Weskamp, K. Kelly, H. M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig, and C. P. Blobel, "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands," *J. Cell Biol.*, vol. 164, no. 5, pp. 769–779, 2004.
- [338] K. Horiuchi, T. Miyamoto, H. Takaishi, a. Hakozaiki, N. Kosaki, Y. Miyauchi, M. Furukawa, J. Takito, H. Kaneko, K. Matsuzaki, H. Morioka, C. P. Blobel, and Y. Toyama, "Cell Surface Colony-Stimulating Factor 1 Can Be Cleaved by TNF-Converting Enzyme or Endocytosed in a Clathrin-Dependent Manner," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 10, pp. 6715–6724, 2007.
- [339] J. R. Doedens and R. A. Black, "Stimulation-induced Down-regulation of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme *," vol. 275, no. 19, pp. 14598–14607, 2000.
- [340] H. J. Cho, J. H. Kang, J. Y. Kwak, T. S. Lee, I. S. Lee, N. G. Park, H. Nakajima, J. Magae, and Y. C. Chang, "Ascofuranone suppresses PMA-mediated matrix metalloproteinase-9 gene activation through the Ras/Raf/MEK/ERK- and Ap1-dependent mechanisms," *Carcinogenesis*, vol. 28, no. 5, pp. 1104–1110, 2007.
- [341] S. M. Le Gall, T. Maretzky, P. D. a Issuree, X.-D. Niu, K. Reiss, P. Saftig, R. Khokha, D. Lundell, and C. P. Blobel, "ADAM17 is regulated by a rapid and reversible

- mechanism that controls access to its catalytic site.," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 22, pp. 3913–3922, 2010.
- [342] D. Hahn, A. Pischitzis, S. Roesmann, M. K. Hansen, B. Leuenberger, U. Luginbuehl, and E. E. Sterchi, "Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-induced Ectodomain Shedding and Phosphorylation of the Human Meprin β Metalloprotease," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 44, pp. 42829–42839, 2003.
- [343] R. Romee, B. Foley, T. Lenvik, Y. Wang, B. Zhang, D. Ankarlo, X. Luo, S. Cooley, M. Verneris, B. Walcheck, and J. Miller, "NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17)," *Blood*, vol. 121, no. 18, pp. 3599–3608, 2013.
- [344] C. Berset, S. Aud  tat, J. Tietz, T. Gunde, A. Barberis, A. Schumacher, and P. Traxler, "Protein Kinase Inhibitors," vol. 105, pp. 95–105, 2005.
- [345] B. N. Kholodenko, "MAP kinase cascade signaling and endocytic trafficking: A marriage of convenience?," *Trends Cell Biol.*, vol. 12, no. 4, pp. 173–177, 2002.
- [346] B. Enjalbert, D. a Smith, M. J. Cornell, I. Alam, S. Nicholls, A. J. P. Brown, and J. Quinn, "Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*," *Mol. Biol. Cell*, vol. 17, no. 2, pp. 1018–1032, 2006.
- [347] Y. Gan, C. Shi, L. Inge, M. Hibner, J. Balducci, and Y. Huang, "Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells," *Oncogene*, vol. 29, no. 35, pp. 4947–4958, 2010.
- [348] J.-F. Bouchard, K. E. Horn, T. Stroh, and T. E. Kennedy, "Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1.," *J. Neurochem.*, vol. 107, no. 2, pp. 398–417, Oct. 2008.
- [349] T. Schneider-poetsch, J. Ju, D. E. Eyler, Y. Dang, S. Bhat, W. C. Merrick, R. Green, B. Shen, and J. O. Liu, "NIH Public Access," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 6, no. 3, pp. 209–217, 2010.
- [350] X. Li, E. Saint-Cyr-Proulx, K. Aktories, and N. Lamarche-Vane, "Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 17, pp. 15207–15214, 2002.
- [351] A. W. Harrington, Q. M. Li, C. Tep, J. B. Park, Z. He, and S. O. Yoon, "The role of Kalirin9 in p75/Nogo receptor-mediated RhoA activation in cerebellar granule neurons," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 36, pp. 24690–24697, 2008.
- [352] Y. Arakawa, H. Bito, T. Furuyashiki, T. Tsuji, S. Takemoto-Kimura, K. Kimura, K. Nozaki, N. Hashimoto, and S. Narumiya, "Control of axon elongation via an SDF-

- 1 α /Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons," *J. Cell Biol.*, vol. 161, no. 2, pp. 381–391, 2003.
- [353] F. Causeret, M. Hidalgo-Sanchez, P. Fort, S. Backer, M.-R. Popoff, C. Gauthier-Rouvière, and E. Bloch-Gallego, "Distinct roles of Rac1/Cdc42 and Rho/Rock for axon outgrowth and nucleokinesis of precerebellar neurons toward netrin 1," *Development*, vol. 131, no. 12, pp. 2841–2852, 2004.
- [354] S. Garel and G. López-Bendito, "Inputs from the thalamocortical system on axon pathfinding mechanisms.," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 27C, pp. 143–150, 2014.
- [355] K. Wong, X. R. Ren, Y. Z. Huang, Y. Xie, G. Liu, H. Saito, H. Tang, L. Wen, S. M. Brady-Kalnay, L. Mei, J. Y. Wu, W. C. Xiong, and Y. Rao, "Signal transduction in neuronal migration: Roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway," *Cell*, vol. 107, no. 2, pp. 209–221, 2001.
- [356] H. Hu, M. Li, J.-P. Labrador, J. McEwen, E. C. Lai, C. S. Goodman, and G. J. Bashaw, "Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 12, pp. 4613–4618, 2005.
- [357] A. Lundström, M. Gallio, C. Englund, P. Steneberg, J. Hemphälä, P. Aspenström, K. Keleman, L. Falileeva, B. J. Dickson, and C. Samakovlis, "Vilse, a conserved Rac/Cdc42 GAP mediating Robo repulsion in tracheal cells and axons," *Genes Dev.*, vol. 18, no. 17, pp. 2161–2171, 2004.
- [358] L. Yang and G. J. Bashaw, "Son of Sevenless Directly Links the Robo Receptor to Rac Activation to Control Axon Repulsion at the Midline," *Neuron*, vol. 52, no. 4, pp. 595–607, 2006.
- [359] X. Fan, J. P. Labrador, H. Hing, and G. J. Bashaw, "Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline," *Neuron*, vol. 40, no. 1, pp. 113–127, 2003.
- [360] J. L. Fritz and M. F. VanBerkum, "Calmodulin and son of sevenless dependent signaling pathways regulate midline crossing of axons in the Drosophila CNS.," *Development*, vol. 127, no. 9, pp. 1991–2000, 2000.
- [361] G. Gallo, "RhoA-kinase coordinates F-actin organization and myosin II activity during semaphorin-3A-induced axon retraction.," *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. Pt 16, pp. 3413–3423, 2006.
- [362] J. M. Swiercz, R. Kuner, J. Behrens, and S. Offermanns, "Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology," *Neuron*, vol. 35, no. 1, pp. 51–63, 2002.
- [363] A. Murray, A. Naeem, S. H. Barnes, U. Drescher, and S. Guthrie, "Slit and Netrin-1 guide cranial motor axon pathfinding via Rho-kinase, myosin light chain kinase

and myosin II.," *Neural Dev.*, vol. 5, p. 16, 2010.

- [364] D. Barberis, A. Casazza, R. Sordella, S. Corso, S. Artigiani, J. Settleman, P. M. Comoglio, and L. Tamagnone, "p190 Rho-GTPase activating protein associates with plexins and it is required for semaphorin signalling.," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 20, pp. 4689–4700, 2005.
- [365] M. Shekarabi and T. E. Kennedy, "The netrin-1 receptor DCC promotes filopodia formation and cell spreading by activating Cdc42 and Rac1.," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–17, 2002.
- [366] W. M. Journey, G. Gallo, P. C. Letourneau, and S. C. McLoon, "Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2- and semaphorin 3A-induced growth cone collapse.," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 14, pp. 6019–6028, 2002.
- [367] B. J. Dickson, "Rho GTPases in growth cone guidance," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 11, no. 1, pp. 103–110, 2001.
- [368] H. Matsumoto and M. Nagashima, "Netrin-1 elevates the level and induces cluster formation of its receptor DCC at the surface of cortical axon shafts in an exocytosis-dependent manner," *Neurosci. Res.*, vol. 67, no. 2, pp. 99–107, 2010.
- [369] D. S. Garbe and G. J. Bashaw, "Independent functions of Slit-Robo repulsion and Netrin-Frazzled attraction regulate axon crossing at the midline in *Drosophila*.," *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 13, pp. 3584–3592, 2007.
- [370] M. Kim, T. Fontelonga, A. P. Roesener, H. Lee, S. Gurung, P. R. F. Mendonca, and G. S. Mastick, "Motor neuron cell bodies are actively positioned by Slit/Robo repulsion and Netrin/DCC attraction," *Dev. Biol.*, vol. 399, no. 1, pp. 68–79, 2015.
- [371] M. Kim, W. T. Farmer, B. Bjorke, S. a McMahon, P. J. Fabre, F. Charron, and G. S. Mastick, "Pioneer midbrain longitudinal axons navigate using a balance of Netrin attraction and Slit repulsion.," *Neural Dev.*, vol. 9, no. 1, p. 17, 2014.
- [372] G. Gatto, D. Morales, A. Kania, and R. Klein, "EphA4 Receptor Shedding Regulates Spinal Motor Axon Guidance," *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 20, pp. 2355–2365, 2014.
- [373] Y. Taniguchi, S. H. Kim, and S. S. Sisodia, "Presenilin-dependent 'γ-secretase' processing of deleted in colorectal cancer (DCC)," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 33, pp. 30425–30428, 2003.
- [374] G. Bai, O. Chivatakarn, D. Bonanomi, K. Lettieri, L. Franco, C. Xia, E. Stein, L. Ma, J. W. Lewcock, and S. L. Pfaff, "Presenilin-dependent receptor processing is required for axon guidance," *Cell*, vol. 144, no. 1, pp. 106–118, 2011.
- [375] S. Yamagishi, F. Hampel, K. Hata, D. Del Toro, M. Schwark, E. Kvachnina, M.

Bastmeyer, T. Yamashita, V. Tarabykin, R. Klein, and J. Egea, "FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons.," *EMBO J.*, vol. 30, no. 14, pp. 2920–33, Jul. 2011.

ANNEX

FLRT3 Is a Robo1-Interacting Protein that Determines Netrin-1 Attraction in Developing Axons

Eduardo Leyva-Díaz,¹ Daniel del Toro,^{2,3} Maria José Menal,⁴ Serafi Cambray,⁴ Rafael Susín,¹ Marc Tessier-Lavigne,⁵ Rüdiger Klein,^{2,3,6} Joaquim Egea,^{4,6,*} and Guillermina López-Bendito^{1,6,*}

¹Instituto de Neurociencias de Alicante, CSIC and Universidad Miguel Hernández, 03550 Sant Joan d'Alacant, Spain

²Department of Molecules - Signals - Development, Max Planck Institute of Neurobiology, 82152 Martinsried, Germany

³Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy), 80336 Munich, Germany

⁴Molecular and Developmental Neurobiology Group, IRBLLLEIDA, University of Lleida, 25198 Lleida, Spain

⁵Laboratory of Brain Development and Repair, Rockefeller University, New York, NY 10065, USA

Summary

Background: Guidance molecules are normally presented to cells in an overlapping fashion; however, little is known about how their signals are integrated to control the formation of neural circuits. In the thalamocortical system, the topographical sorting of distinct axonal subpopulations relies on the emergent cooperation between Slit1 and Netrin-1 guidance cues presented by intermediate cellular targets. However, the mechanism by which both cues interact to drive distinct axonal responses remains unknown.

Results: Here, we show that the attractive response to the guidance cue Netrin-1 is controlled by Slit/Robo1 signaling and by FLRT3, a novel coreceptor for Robo1. While thalamic axons lacking FLRT3 are insensitive to Netrin-1, thalamic axons containing FLRT3 can modulate their Netrin-1 responsiveness in a context-dependent manner. In the presence of Slit1, both Robo1 and FLRT3 receptors are required to induce Netrin-1 attraction by the upregulation of surface DCC through the activation of protein kinase A. Finally, the absence of FLRT3 produces defects in axon guidance *in vivo*.

Conclusions: These results highlight a novel mechanism by which interactions between limited numbers of axon guidance cues can multiply the responses in developing axons, as required for proper axonal tract formation in the mammalian brain.

Introduction

Understanding how a fairly limited number of axon guidance cues can set up the pattern of connections that is required to form functional neural networks remains a challenge. One explanation may arise from the fact that several axon guidance cues can produce distinct responses depending on the nature and levels of the guidance receptors at the cell surface [1]. The best-documented example of this is Netrin-1, one of the most prominent and influential axon guidance

cues for developing axons in the CNS of both vertebrates and invertebrates [2]. Netrins are bifunctional proteins that attract several classes of axons but repel others, depending on the receptors with which they interact on the cell surface and the internal state of the growth cone. The binding of Netrin-1 to the deleted in colorectal carcinoma (DCC) receptor signals attraction, whereas its binding to Unc5-type receptors triggers repulsion [3]. Mechanisms that regulate the surface levels of DCC and Unc5 receptors to control this response to Netrin-1 have been previously reported. For instance, activation of protein kinase C (PKC) leads to the endocytotic internalization of Unc5 receptors, reducing growth cone collapse and changing the response to Netrin-1 from repulsion to attraction [4, 5]. Conversely, protein kinase A (PKA) mobilizes an intracellular pool of DCC, increasing its abundance at the cell surface and enhancing axon outgrowth [6, 7].

The behavior of axons is also regulated by third-party proteins that modulate the responses to the distinct guidance signals [8, 9]. For instance, the Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) collaborates with DCC in mediating the turning responses of spinal commissural neurons to Netrin-1 [10]. Moreover, Unc5 receptors were also recently shown to bind *in trans* to FLRT3 [11, 12], a member of the fibronectin leucine-rich repeat transmembrane protein family involved in synapse formation and in the regulation of fibroblast growth factor (FGF) receptor signaling [13, 14]. FLRT3 binding to Unc5B receptors activates Unc5 repulsive signaling [15], although how this interaction influences nervous system development has not yet been studied *in vivo*.

Finally, the axon's responses can be influenced by crosstalk between distinct receptor-signaling pathways involved in guidance [16]. For instance, Netrin-1 attenuates Slit/Robo1 repulsion in precrossing callosal axons to allow them to cross the midline of the developing brain [17], whereas in postcrossing commissural spinal cord axons, the Slit receptor Robo1 silences Netrin-1 attraction to help axons project away from the floor plate [18, 19]. In the thalamocortical system, one of the most prominent higher-level processing connections in the mammalian brain [20], Slit1 acts permissively, conferring responsiveness to Netrin-1 [21]. Whereas Slit1 enables Netrin-1 attraction in a subset of thalamocortical axons (TCAs), for others Slit1 exerts a repulsive response, contributing to the topographical arrangement of this connectivity. Thus, the Slit1 and Netrin-1 cues can be integrated by the axon in a hierarchical, cell-context-dependent manner, whereby one cue might be dominant and suppress the effect of the other (callosal and commissural axons) or might be permissive (such as in specific subsets of TCAs). However, it remains unclear how separate signals are integrated into coherent instructions for correct axon growth.

Here, we discovered a novel mechanism by which crosstalk between axon guidance cues is integrated in developing axons. We found that FLRT3 is a Robo1-interacting protein that acts as a context-dependent modulator of Netrin-1 attraction in thalamic axons. FLRT3 is necessary to gain competence for Netrin-1 attraction and is sufficient to modify the

*These authors contributed equally to this work

*Correspondence: joaquim.egea@cmb.ucl.cat (J.E.), g.l.bendito@umh.es (G.L.-B.)

response to Netrin-1 in Robo1-expressing axons. The mechanism described here might explain how molecularly similar developing axons tune their response to Slit1 and Netrin-1 by simply regulating FLRT3 expression.

Results

Modulation of Netrin-1 Responsiveness Requires DCC Upregulation

We previously showed that developing TCAs are not attracted by Netrin-1 unless the repulsive axon guidance cue Slit1 is present. Moreover, this effect is specific to rostral TCAs (rTCAs) because DCC-expressing intermediate TCAs (iTCAs) are not attracted to Netrin-1, neither alone nor in the presence of Slit1 [21]. Given that rTCAs express DCC under basal conditions but do not respond to Netrin-1, we tested whether the modulation of the Netrin-1 attractive response requires an upregulation of DCC at the membrane in rostral axons. Indeed, the combination of Slit1 and Netrin-1—but neither alone—induced a significant increase in DCC in the membrane of growth cones (Figures 1A–1D') specifically in rTCAs (Figure 1E). This effect may result from increased vesicular transport to the plasma membrane, because we found a decrease in the pool of internal DCC colocalizing with VAMP2 and Rab11 immunoreactivity [22] upon Slit1 plus Netrin-1 stimulation as compared to the unstimulated basal state (Figures S1A–S1G available online; data not shown), whereas there was an increase in surface DCC (Figures S1A and S1D). These results were confirmed in biotinylation assays (Figures 1F and 1G), raising the possibility that upregulation of DCC might be required to gain competence to respond to Netrin-1 attraction. Indeed, we found that a large proportion of surface DCC colocalizes with Robo1 under basal conditions, whereas this percentage decreased significantly when costimulated with Slit1 and Netrin-1, with an increase in the amount of free DCC receptors at the membrane (Figures S1H–S1O).

It is known that PKA activation is required for the recruitment of DCC-containing vesicles to the plasma membrane [6, 7]. PKA phosphorylates the PP-1 inhibitory protein I-1 (phospho-I-1) in growth cones [23, 24], and thus phospho-I-1 staining is an indicator of PKA activity. We found that phospho-I-1 staining in rTCA growth cones was significantly higher when stimulated with the combination of Slit1 plus Netrin-1 than in control conditions (Figures 1H–1J); this increase was not observed in the presence of a PKA inhibitor (KT5720) or in iTCA growth cones (Figure 1J). Moreover, both an adenylate cyclase inhibitor (SQ22536) and KT5720 abolished the upregulation of DCC at the surface of rTCA growth cones (Figures S1P–S1S), suggesting that the modulation of Netrin-1 responsiveness by Slit1 requires the activation of PKA signaling. The increase in PKA activity in rTCAs was confirmed by western blot (Figures 1K and 1L).

To confirm that DCC is required in rTCAs for the Slit1-induced attractive response to Netrin-1, we confronted rTCA explants (embryonic day 13.5 [E13.5]) from either *Dcc*^{+/+} or *Dcc*^{-/-} mice with aggregates of COS7 cells expressing Netrin-1 in which soluble Slit1 was applied to trigger attraction (Figure 1M). In *Dcc*^{-/-} explants, the Slit1-induced attraction to Netrin-1 was abolished (Figures 1N and 1O) as compared to *Dcc*^{+/+}, confirming that DCC function is critical in producing this response. Similar results were found when a well-characterized anti-DCC blocking antibody [25] was used (data not shown).

Slit1 Enables Netrin-1 Attraction through Robo1 Receptor Activation

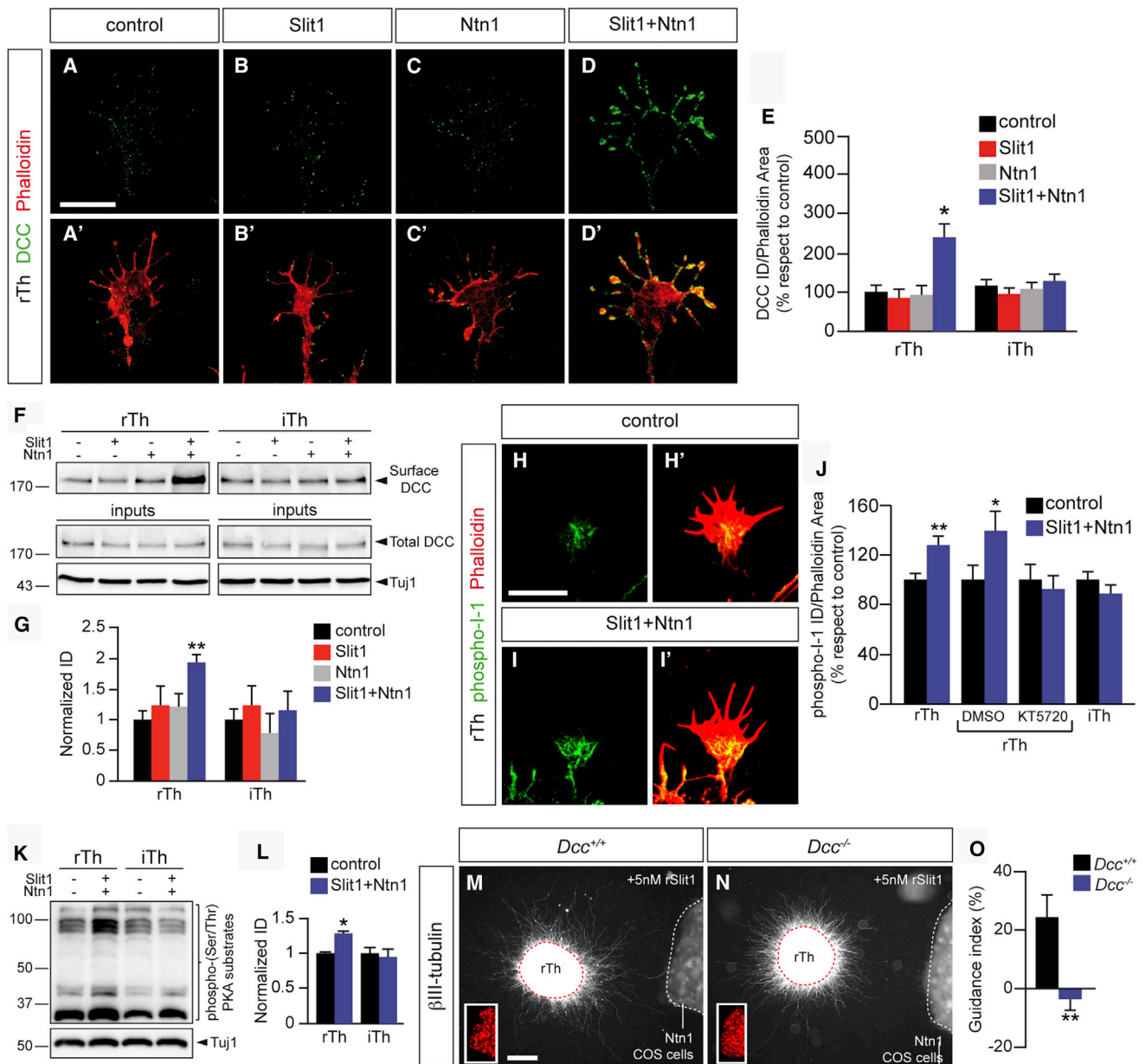
The fact that Slit1 enables Netrin-1 to attract rTCAs suggests that Robo receptors might be implicated in mediating this behavior. To test this possibility, we examined the response of rTCAs to Netrin-1 plus Slit1 in explants of mice lacking Robo1, Robo2, or both receptors. The attraction to Netrin-1 induced by Slit1 was lost in rTCAs lacking both Robo1 and Robo2 receptors (Figures 2A–2D), demonstrating that activation of Robo receptors is necessary for these TCAs to be attracted to Netrin-1. To determine which of the two Robo receptors was implicated in this process, we confronted rostral thalamic explants from *Robo1* or *Robo2* single mutants with Netrin-1-expressing COS7 cells in the presence or absence of Slit1. When *Robo2*-deficient rTCAs were confronted with Netrin-1 plus Slit1, the attractive response persisted (Figures 2E and 2F). Moreover, Slit1 repulsive activity was lost in *Robo2*^{-/-} rTCAs, but not when explants from *Robo1*-deficient mice were tested (Figure S2), suggesting that Robo1 might modulate the Netrin-1 response rather than mediate the Slit1 repulsive response in these neurons. By contrast, the attractive response to Netrin-1 induced by Slit1 was lost in *Robo1*^{-/-} rTCAs (Figures 2G and 2H), demonstrating the need for Robo1 in the attractive response to Netrin-1.

We assessed whether Robo1 activity might be necessary for the upregulation of cell-surface DCC in rTCAs following exposure to Slit1 and Netrin-1. Unlike in the wild-type controls, surface DCC expression was not upregulated in *Robo1*^{-/-} rTCA growth cones (Figures 2I–2M), demonstrating that Robo1 signaling is necessary to mediate the increase in surface DCC. Consequently, we found that phospho-I-1 levels were not increased in *Robo1*^{-/-} rTCAs by costimulation (Figures 2N–2P), demonstrating the implication of Robo1 receptor in inducing PKA activation by Slit1 and Netrin-1 combination.

Rostral TCAs Express High Levels of FLRT3

Although the results obtained directly implicate the activation of Robo1 in the modulation of Netrin-1 attraction, they do not explain the cell-type specificity, given that iTCAs express similar levels of Robo1 as rTCAs ([21]; Figure S3). Therefore, it seemed necessary to search for other molecular differences that might underlie this specificity. The fibronectin and leucine-rich transmembrane proteins (FLRT1–3) have recently been shown to bind *in trans* to Unc5 receptors [11, 12] and to modulate pyramidal neuron migration within the developing cortex [15]. Thus, we wondered whether, together with Robo1, FLRT proteins might modulate the Netrin-1 response in developing TCAs.

Among the three known FLRT family members, developing thalamic neurons express *Flrt3* mRNA in a decreasing rostral-to-caudal gradient, as witnessed by *in situ* hybridization (Figures 3A and 3B; data not shown). This gradient was confirmed by X-Gal staining in sections of a FLRT3 reporter line in which β -galactosidase expression is driven by the *Flrt3* promoter (*Flrt3* ^{β gal/loxP}; Figures 3C and 3D) and in dissociated thalamic neurons from these mice, in which the number of neurons expressing β -galactosidase was significantly higher in rostral cultures than in intermediate cultures (Figures 3E–3G). The greater amount of FLRT3 protein in lysates from rostral thalamic cultures corroborated these results (Figures 3H and 3I), as was also evident in the growth cones of rostral thalamic neurons (Figures 3J–3M'). Together, these results show that FLRT3 is specifically enriched in rTCAs, and, therefore, it may play a role in the development of their axons.



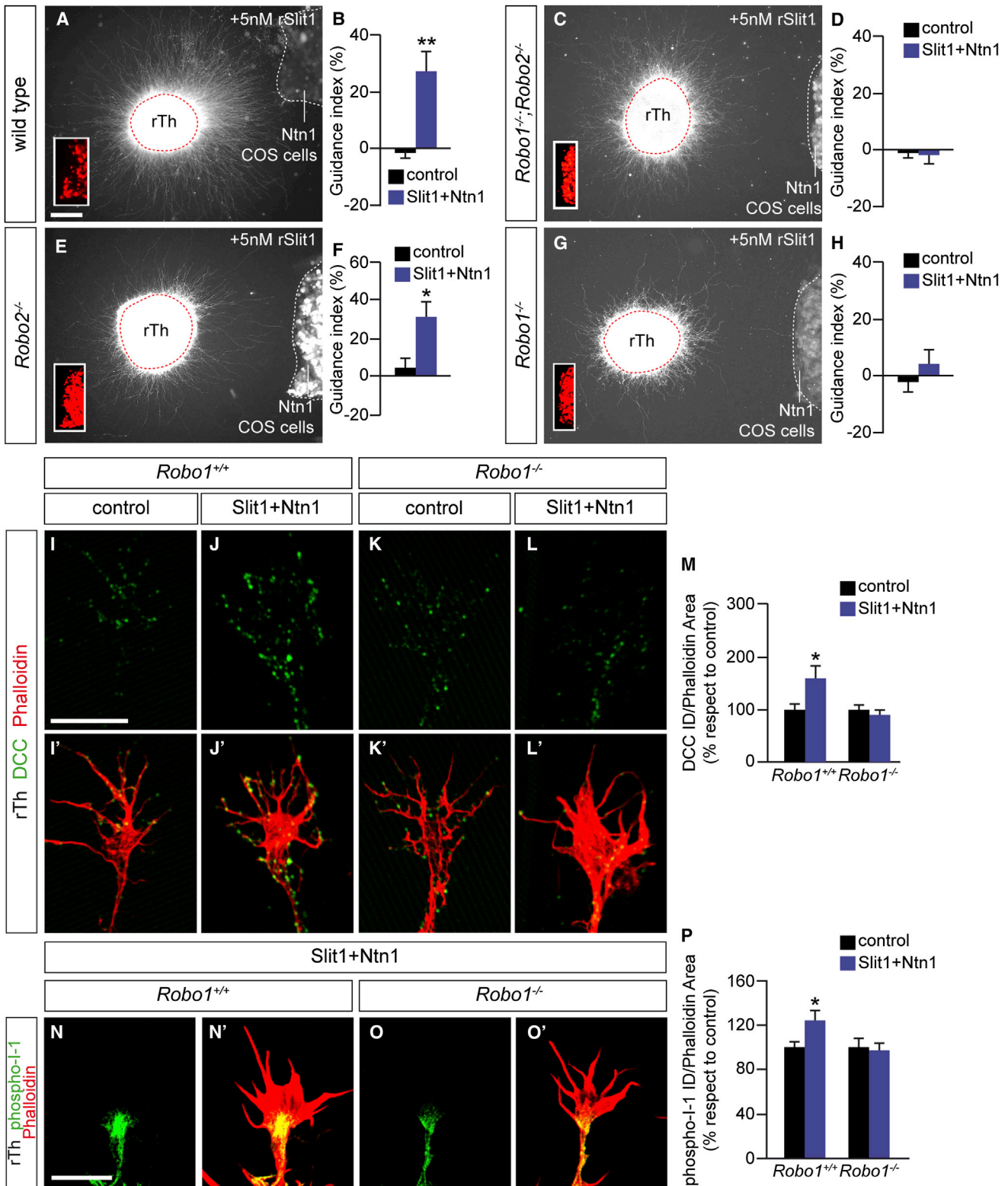


Figure 2. Slit1 Enables Netrin-1 Attraction by Activating the Robo1 Receptor

(A–H) Wild-type (A) and *Robo2^{-/-}* (E) rTCA explants are attracted to Netrin-1-expressing COS7 cells in the presence of rSlit1, while explants lacking the Robo1 receptor (C, *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* and G, *Robo1^{-/-}*) grow symmetrically. $n \geq 32$ wild-type explants per condition; $n \geq 32$ *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* explants per condition; $n \geq 9$ *Robo2^{-/-}* explants per condition; $n \geq 27$ *Robo1^{-/-}* explants per condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, two-tailed Student's t test.

(I–L') DCC surface immunostaining of nonpermeabilized *Robo1^{+/+}* (I–J') and *Robo1^{-/-}* (K–L') growth cones from E13.5 rostral cultured thalamic neurons after 2 days in vitro.

(legend continued on next page)

FLRT3 Is a New Robo1-Interacting Protein

To better understand the possible function of FLRT3 in the thalamus, we used the mouse FLRT3 intracellular domain (FLRT3^{ICD}, amino acids 553–649) as bait in a yeast two-hybrid screen of a human fetal brain cDNA library (Figure S4A). Among the positive hits, one cDNA encoded the Robo1 protein (amino acids 449–1,182; Figures S4B and S4C), while Robo2 was not detected as an interacting partner. Robo1 and FLRT3 interaction was validated in coimmunoprecipitation experiments performed on HEK293T cells transiently transfected with full-length Robo1 and FLRT3 cDNAs (Figures 4A–4D). Deletion of the intracellular domain (ICD) of FLRT3 (Figure 4A) or that of Robo1 (Figure 4E) abolished this association, suggesting that the interaction between Robo1 and FLRT3 takes place mainly in *cis* through their cytoplasmic domains.

Robo1 ICDs are known to be required for Slit1-mediated repulsion [26, 27], and therefore, the binding of FLRT3 to the cytoplasmic domains of Robo1 could modify its repulsive activity. To test this, we performed growth cone collapse assays in response to Slit1, comparing FLRT3-positive rTCAs with FLRT3-negative iTCA neurons. We used *Robo2*^{-/-} cultures to avoid Robo2 receptor interference in the assay. Both *Robo2*^{+/+} and *Robo2*^{-/-} iTCA growth cones collapse in response to Slit1 (Figure S4H), suggesting that Robo1 function is enough to mediate Slit1 repulsive activity in these axons. However, while Slit1 collapsed *Robo2*^{+/+} rTCA growth cones, Slit1 repulsive activity was abolished in *Robo2*^{-/-} rTCA growth cones (Figures S4D–S4H). Together with the lack of Slit1-mediated repulsion in rTCA from *Robo2* mutants that we have previously observed (Figures S2G–S2I), these data suggest that FLRT3 present in rTCAs may modulate Slit1/Robo1 repulsion.

Finally, we detected Robo1 when FLRT3 was immunoprecipitated from protein extracts of dissociated thalamic neurons (Figure 4F), and these two proteins colocalized in rostral thalamic growth cones (Figures 4G–4K), strongly suggesting that they interact in TCAs.

FLRT3 Is Necessary to Mediate Slit1-Induced Netrin-1 Attraction

Because Robo1 is required by rTCAs for the Slit1-induced switch in Netrin-1 responsiveness, we tested whether FLRT3 activity is also involved in this process. As such, we confronted control and *Flrt3* nervous system conditional mutant (*Flrt3*^{βgal/lx;NesCre}) rostral thalamic explants with COS7 cells expressing Netrin-1 in the presence of Slit1. The lack of FLRT3 abolished the switch toward Netrin-1 attraction (Figures 5A–5C), demonstrating that FLRT3 and Robo1 are both necessary for such attraction to occur. The addition of a recombinant protein containing only the extracellular domain of FLRT3 to these cultures did not elicit attraction to the Netrin-1 stimuli of the *Flrt3*-conditional mutant rTCAs (Figure S5), suggesting that the intracellular domain of the FLRT3 protein is crucial for attraction to occur. Moreover, the fact that FLRT3 interacts with Robo1 in thalamic neurons (Figure 4F) and that a large percentage of the surface FLRT3 colocalizes with Robo1 in rostral growth cones (Figures 4G–4K) suggest that the function of FLRT3 in mediating this attraction might be due to its interaction with the Robo1 signaling pathway.

Having shown that DCC upregulation at the membrane strongly correlated with the switch toward Netrin-1 attraction, we tested whether this upregulation occurred in the absence of *Flrt3*. Unlike control TCAs, the combination of Slit1 and Netrin-1 did not induce an increase in surface DCC levels in *Flrt3* conditional mutant rTCAs (Figures 5D–5H). Furthermore, the increase in phospho-I-1 induced by Slit1 and Netrin-1 costimulation did not occur in rTCAs in the absence of *Flrt3* (Figures 5I–5K). Altogether, these results strongly suggest that FLRT3 and Robo1 modulate the Netrin-1 response in developing rTCAs by increasing the abundance of DCC receptors at the plasma membrane of the growth cones via PKA activation.

FLRT3 Expression Is Sufficient to Alter the Response to Netrin-1 in Robo1-Expressing Axons

Robo1 and FLRT3 levels remain unchanged in rostral thalamic growth cones of *Flrt3* conditional mutant and in *Robo1*^{-/-} mutant mice, respectively (Figure S6). Hence, it would appear that neither Robo1 nor FLRT3 activity alone is sufficient to trigger the attractive behavior and that both proteins must be present. Thus, we hypothesized that ectopic expression of FLRT3 in nonresponsive iTCA that contain Robo1 may be sufficient to trigger this attractive behavior. Indeed, electroporation of a *Flrt3* expression vector into iTCA specifically provoked the switch toward Netrin-1 attraction (Figures 6A–6D), demonstrating that FLRT3 expression is sufficient to modulate the Netrin-1 response in axons that express Robo1. We further asked whether FLRT3 overexpression in nonresponsive iTCA would be sufficient to drive their axons to a more rostral position in the ventral telencephalon, in a manner similar to rostral axons. To test this, we determined the function of FLRT3 in iTCA pathfinding *ex vivo* by coculturing intermediate explants expressing *Flrt3* in 45° corridor host slices [21] (Figure 6E). Whereas mock-electroporated intermediate axons navigated at rostro-intermediate levels in the subpallium, most of the axons expressing *Flrt3* grew rostrally (Figures 6F–6H), again indicating that FLRT3 is sufficient to transform the behavior of iTCA to that of rTCAs. Moreover, because we hypothesized that the ability of FLRT3 to change iTCA behavior depends on the presence of Robo1, we performed similar coculture experiments using iTCA explants from *Robo1*^{+/+} or *Robo1*^{-/-} embryos electroporated with *Flrt3* and cocultured into wild-type 45° corridor host slices (Figure 6I). Ectopic expression of FLRT3 in intermediate thalamic neurons mutant for *Robo1* was not able to transform the behavior of iTCA (Figures 6J–6L), demonstrating that both receptors are necessary to trigger the attractive response.

Finally, phospho-I-1 staining after Slit1 and Netrin-1 costimulation was significantly higher in iTCA growth cones by the ectopic expression of FLRT3 (Figures 6M–6P), strongly suggesting the involvement of PKA activity in the mechanism of switch in Netrin-1 responsiveness.

Abnormal Pathfinding of TCAs in the Absence of FLRT3 In Vivo

Specifically, a decreasing rostral-to-caudal gradient of Slit1 and Netrin-1 is provided by corridor cells in the ventral

(M) Quantification of the data shown in (I)–(L). $n \geq 80$ growth cones per condition. * $p < 0.05$, two-tailed Student's *t* test.

(N–O) Phospho-I-1 staining on *Robo1*^{+/+} (N) or *Robo1*^{-/-} (O) E13.5 rostral thalamic growth cones.

(P) Quantification of the data represented in (N) and (O) and data not shown. $n \geq 89$ growth cones per condition. * $p < 0.05$, two-tailed Student's *t* test. rTh, rostral thalamus; rSlit1, recombinant Slit1 protein; ID, integrated density. The data are presented as the mean + SEM. Scale bars represent 150 μm (A–G), 10 μm (I–L), and 5 μm (N–O). See also Figure S2.

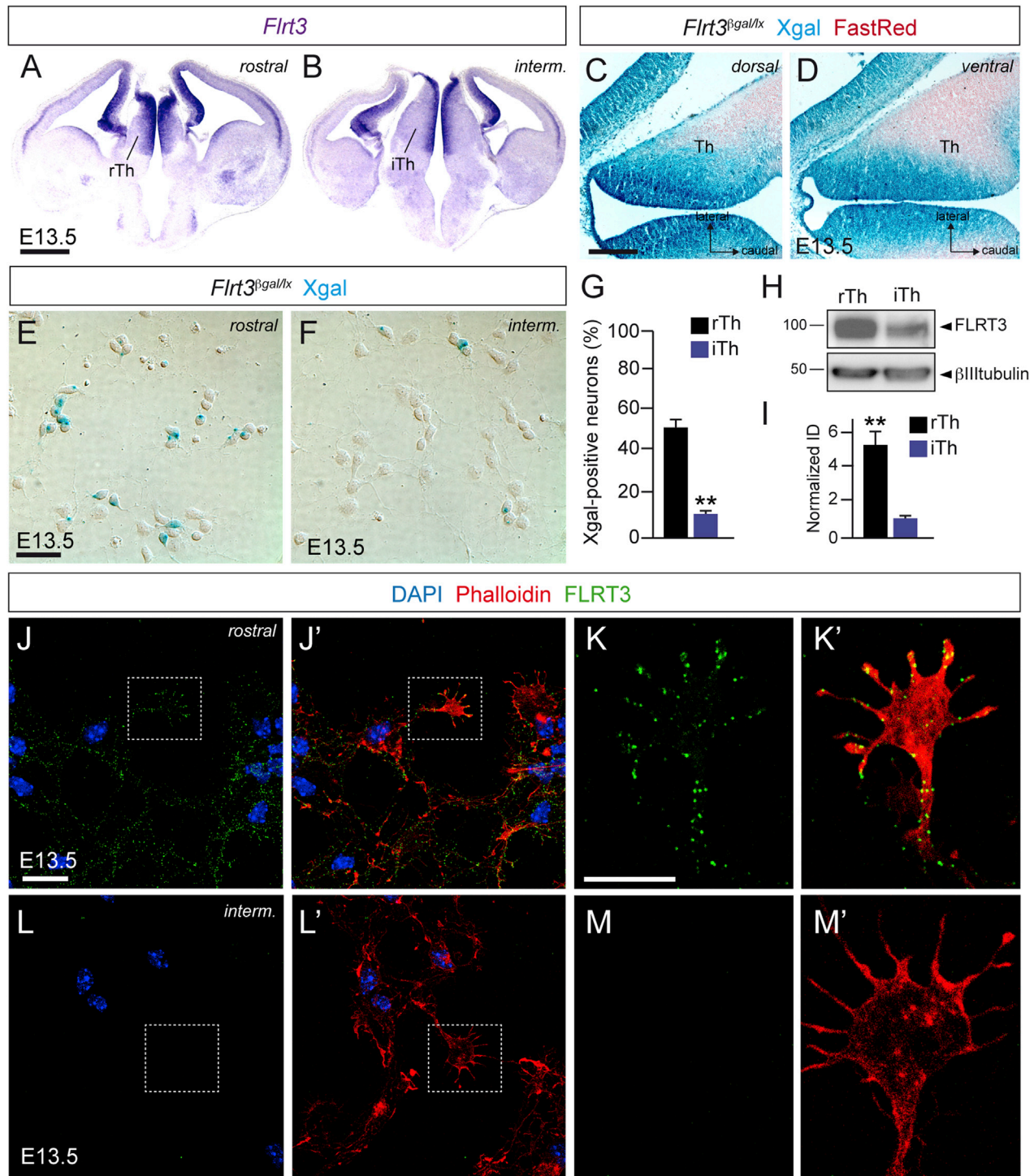


Figure 3. Rostral TCAs Express High Levels of FLRT3

(A and B) Serial coronal sections through the telencephalon of E13.5 embryos showing *Flrt3* expression by in situ hybridization.

(C and D) Serial horizontal sections through the telencephalon of E13.5 embryos from a *Flrt3*^{βgal/lx} reporter line counterstained with FastRed.

(E and F) X-Gal staining of dissociated thalamic *Flrt3*^{βgal/lx} cultures showing fewer β-gal stained neurons among the intermediate thalamic neurons than in the rostral neurons.

(G) Quantification of the data presented in (E) and (F). n = 1,933 rTh cells, n = 1,246 iTh cells. **p < 0.01, two-tailed Student's t test.

(H) Western blot showing FLRT3 protein levels in lysates from E13.5 rostral or intermediate thalamic neurons cultured for 48 hr.

(I) Quantification of the data shown in (H) (n = 3). **p < 0.01, two-tailed Student's t test.

(J–M') FLRT3 surface staining of nonpermeabilized rostral (J–K') and intermediate (L–M') dissociated thalamic cultures showing stronger expression in rostral axons.

rTh, rostral thalamus; iTh, intermediate thalamus; interm., intermediate. The data are presented as mean + SEM. Scale bars represent 1 mm (A and B), 200 μm (C and D), 30 μm (E and F), 20 μm (J, J', L, L'), and 10 μm (K, K', M, M'). See also Figure S3.

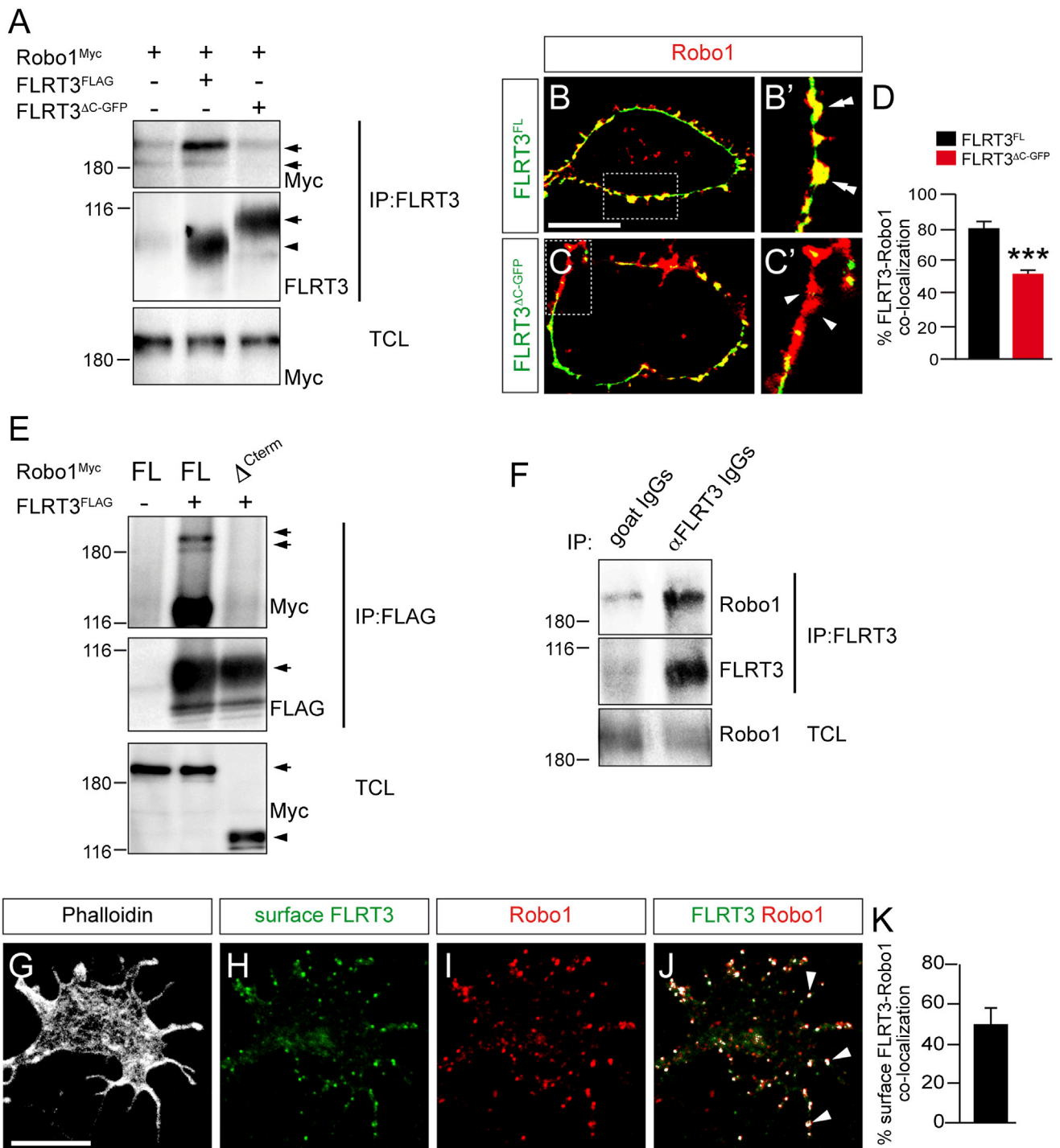


Figure 4. FLRT3 Is a New Robo1-Interacting Protein

(A) FLRT3-Robo1 coimmunoprecipitation in HEK293T cells. As indicated, myc-tagged Robo1, FLRT3, and FLRT3 Δ C-GFP were transiently transfected into HEK293T cells. The protein lysates were immunoprecipitated with an anti-FLRT3 antibody, and the immunoprecipitates were analyzed in western blots probed with antibodies against Myc (upper panel) and FLRT3 (middle panel). The lower panel shows the Robo1 in the total cell lysates (TCL). In the middle panel, the arrow indicates FLRT3 Δ C-GFP, and the arrowhead indicates full-length FLRT3.

(B and C) Colocalization of Robo1 and FLRT3 in HEK293T cells. The cells were cotransfected with full-length FLRT3 (FLRT3^{FL}; B) or FLRT3 Δ C-GFP (C) and Robo1 and then fixed and analyzed by immunofluorescence.

(D) The percentage of Robo1 clusters at the membrane where FLRT3 was also detected (asterisks in B') was quantified and referred to total Robo1 clusters. Arrowheads in (C') point to clusters without FLRT3. $n > 10$ cells. *** $p < 0.001$, two-tailed Student's t test.

(E) Myc-tagged Robo1 lacking the entire ICD (Δ C Robo1) was cotransfected into HEK293T cells with FLRT3 as indicated (full-length [FL] Robo1 was used as a control). Anti-FLAG immunoprecipitates were analyzed in western blots probed with antibodies against Myc (upper panel) and FLAG (middle panel). The lower panel shows the Robo1 in the TCL. The arrows indicate the position of the specific proteins, and the arrowhead in the lower panel shows the position of Δ C Robo1.

(legend continued on next page)

telencephalon (vTel) to attract the rTCAs toward the rostral regions of this structure and ultimately, the cortex [21]. Our data suggest that FLRT3 is sufficient to modulate the response of axons expressing Robo1 to Netrin-1. To test whether FLRT3 is indeed necessary for the positioning of rTCAs in vivo, we performed fine anterograde labeling of the rostral thalamus with Dil in *Flrt3* conditional mutant brains (Figures 7A–7D). We reproducibly observed that in the absence of FLRT3, rTCAs dispersed toward more intermediate levels than in controls, demonstrating that the fine positioning of rTCAs requires FLRT3 activity in these axons. Although the expression patterns for *Slit1* and *Netrin-1* in the vTel are normal in *Flrt3* conditional mutant brains (Figure S7), we performed analysis of the development of rTCAs in a transgenic mouse in which *Flrt3* is specifically removed from the thalamus (*Flrt3*^{lox/lox;Gbx2CreER}, Figures 7E–7H). The conditional *Flrt3* removal from the thalamus mimics the phenotype found in the *Flrt3* nervous system conditional knockout, demonstrating that *Flrt3* expressed in rTCAs is necessary for acquiring their correct topographical information.

Both FLRT3 and Robo1 are necessary to guide rTCAs by changing Netrin-1 responsiveness. Thus, we reasoned that the absence of *Robo1*, but not *Robo2*, should mimic the defect found in *Flrt3* conditional mutant brains. Indeed, rTCAs dispersed more toward intermediate levels in *Robo1*^{-/-} mice than in control mice (Figures 7I–7L), while rTCA dispersion was normal in *Robo2*^{-/-} mice (Figure 7L). Together, these results show that both FLRT3 and Robo1 are required to modulate the response of TCAs to Netrin-1.

In summary, our results demonstrate that the positioning of distinct TCAs that express similar levels of axon guidance receptors is achieved by modulating their response to Netrin-1 through the activity of FLRT3.

Discussion

The correct formation of neural circuits depends on the ability of growing axons to resolve and integrate information from multiple sources when navigating through complex cellular environments. Here, we found that FLRT3 acts as a coreceptor of the Robo1 receptor and that it is required in rTCAs to modulate their Netrin-1 responsiveness in a manner that is crucial for their topographic positioning. Slit1 and Netrin-1 lead to the upregulation of DCC at the surface of the growth cone and to the Netrin-1 attraction through the synergistic action of Robo1 and FLRT3 (Figures 7M and 7N). This FLRT3-Robo1 interaction only occurs in rostral axons, because although iTCAs express DCC and Robo1 receptors, they do not contain FLRT3 and, thus, they are not attracted to Netrin-1. Therefore, our study shows that two different guidance cues, such as Slit1 and Netrin-1, cooperate to modify axonal behaviors through enhancing downstream signals (e.g., PKA), which trigger expression changes of a guidance receptor on the cell surface. Broadly, FLRT3 might act as a context-dependent modulator of axon guidance signals, and this function may emerge as a prevalent strategy to ensure

the sequential switching in axon guidance responses that is necessary to correctly guide developing axons.

Netrin-1 Attraction Involves PKA Activation and DCC Upregulation by Slit1 and Netrin-1

We have shown that the response to Netrin-1 by rTCAs requires the upregulation of surface DCC through cAMP/PKA activation. These results are consistent with the general idea that increases in local cAMP promote axon attraction [28] and with previous findings in commissural neurons showing that PKA activation translocates DCC to the plasma membrane, thereby promoting axon growth and axon turning in response to Netrin-1 [6, 7, 29]. Intracellular DCC pools are more than likely mobilized from microtubule-associated transport vesicles (VAMP2-positive; Figure S1) that are thought to be involved in asymmetric exocytosis during attraction [30]. Intriguingly, although cAMP can modulate the response of axons to Netrin-1, Netrin-1 stimulation of developing axons does not seem to alter endogenous cAMP levels, and thus, other signals would appear to be necessary to activate PKA [31]. We believe that Slit1 signaling is important in this regard, most likely in a crosstalk with Netrin-1 signaling, because DCC is only upregulated at the plasma membrane of rTCAs upon costimulation with Slit1 plus Netrin-1. Thus, it is possible that Slit1 and Netrin-1 signaling are both synergistically required to reach a certain threshold of PKA activation, explaining the requirement for the combination of cues. Thus, PKA could function as a coincidence detector that integrates two different signals in rTCAs, ensuring that the attractive response will only occur when Slit1 and Netrin-1 are present, similar to the proposed role for Ret in axons from the lateral motor column at the spinal cord [8].

Slit/Robo use Rac-specific GTPase-activating proteins (GAPs) and guanine nucleotide exchange factors (GEFs) as intracellular signaling proteins to mediate repulsion [32]. Although variations in cAMP levels modulate Robo-mediated repulsion [33, 34], a direct link between Robo signaling and cAMP/PKA activation has not been reported to date. Thus, it is tempting to speculate that activation of the FLRT3-Robo1 complex by Slit1 in rTCAs might shift the default Robo intracellular cascade from Rac toward PKA activation. Further experiments to explore this possibility are called for.

The Convergence of Slit1 and Netrin-1 Signaling in Developing Axons

In precrossing callosal axons, Netrin-1 attenuates Slit/Robo1 repulsion in order to allow axons to cross the midline in the developing brain [17], whereas in postcrossing commissural spinal cord axons, the Slit receptor Robo1 silences Netrin-1 attraction to help axons project away from the floor plate [18, 19]. In basal conditions, rostral thalamic axons and callosal axons apparently behave similarly, in the sense that Netrin-1 does not exert any chemotactic effect on its own. However, Netrin-1 has two different functions in these systems: its main role in callosal axons is to attenuate Robo signaling and allow the axons to cross the midline, whereas

(F) FLRT3-Robo1 coimmunoprecipitation in rTCA neurons. Protein extracts of E13.5 rostral cultured thalamic neurons after 2 days in vitro were immunoprecipitated with a control goat IgG or with anti-FLRT3 IgGs (raised in goat). The immunoprecipitates were analyzed in western blots probed with antibodies against Robo1 (upper panel) and FLRT3 (middle panel). The lower panel shows the Robo1 in the TCL.

(G–J) FLRT3 surface staining of nonpermeabilized rostral neurons, followed by Robo1 staining, and with phalloidin staining showing the growth cone morphology in white. Arrowheads in (J) indicate colocalization spots.

(K) Quantification of the data shown in (J) (n ≥ 60).

The data are presented as mean + SEM. Scale bars represent 10 μm. See also Figure S4.

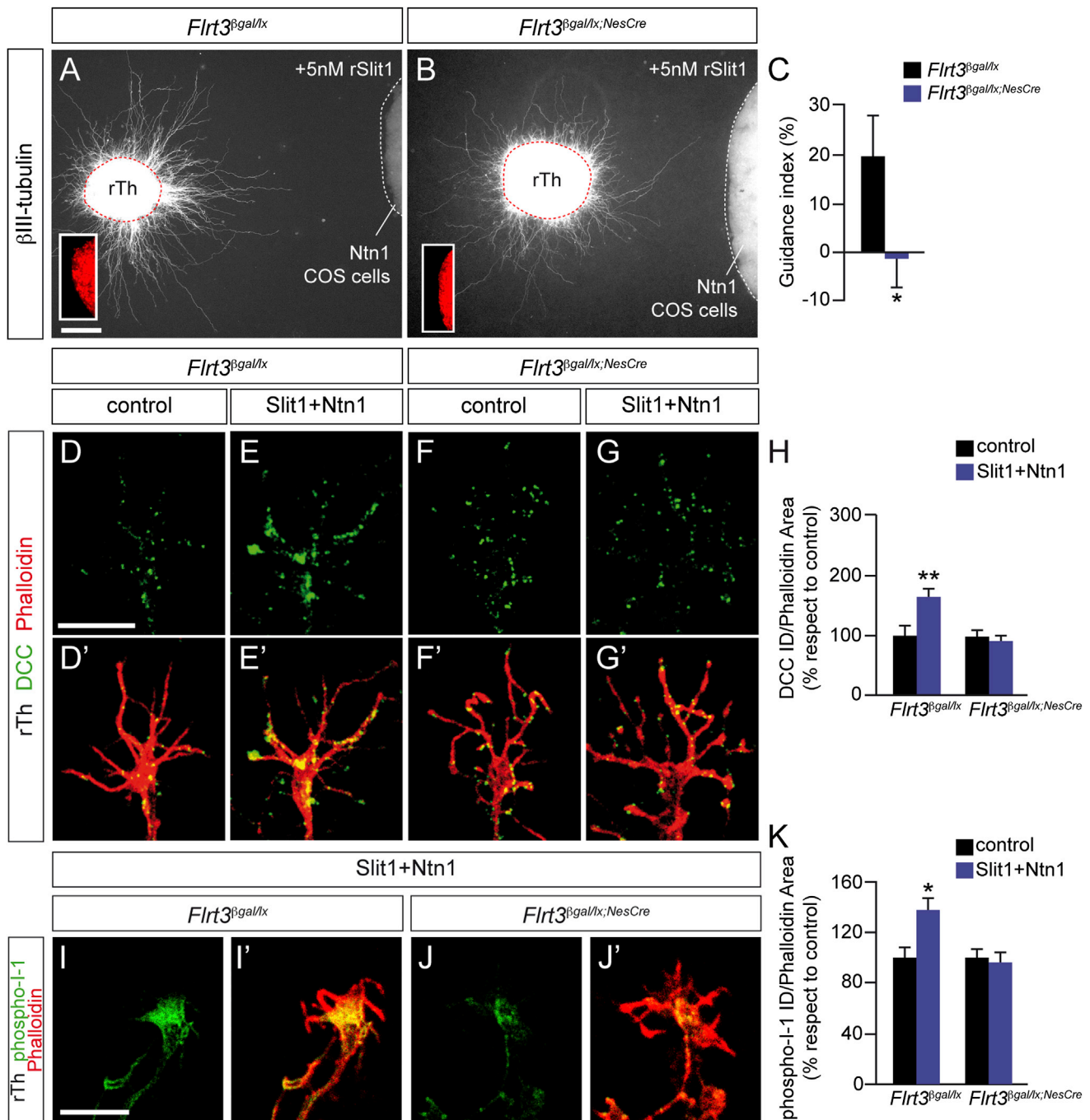


Figure 5. FLRT3 Is Necessary to Mediate Slit1-Induced Netrin-1 Attraction

(A and B) Rostral control (*Flrt3*^{βgal/lx}) axons are attracted to Netrin-1-expressing COS7 cells in the presence of rSlit1 (A), whereas axons from the conditional *Flrt3*^{βgal/lx;NesCre} mutant grow symmetrically (B).

(C) Quantification of the data represented in (A) and (B). n = 25 *Flrt3*^{βgal/lx} explants; n = 16 *Flrt3*^{βgal/lx;NesCre} explants. *p < 0.05, two-tailed Student's t test.

(D–G') DCC surface immunostaining of nonpermeabilized *Flrt3*^{βgal/lx} (D–E') and *Flrt3*^{βgal/lx;NesCre} (F–G') E13.5 rostral thalamic neurons.

(H) Quantification of the data represented in (D)–(G). n ≥ 130 growth cones per condition. **p < 0.01, two-tailed Student's t test.

(I–J') Phospho-I-1 staining on *Flrt3*^{βgal/lx} (I) or *Flrt3*^{βgal/lx;NesCre} (J) E13.5 rostral thalamic growth cones cultured for 48 hr when stimulated with rSlit1 (0.25 μg/ml) plus rNetrin-1 (0.5 μg/ml) for 20 min.

(K) Quantification of the data represented in (I) and (J) and data not shown. n ≥ 75 growth cones per condition. *p < 0.05, two-tailed Student's t test.

rTh, rostral thalamus; rSlit1, recombinant Slit1 protein; ID, integrated density. The data are presented as mean + SEM. Scale bars represent 150 μm (A and B) and 10 μm (D–G'; I–J'). See also Figure S5.

it becomes chemotactic for rTCAs upon the permissive effect of Slit1. Why Slit1 and Netrin-1 have such different effects on axons crossing the midline and on TCAs is currently unknown.

We speculate that on/off decisions that favor hierarchical interactions are taken at the midline. By contrast, topographic maps rely on smooth gradients of signals that trigger more

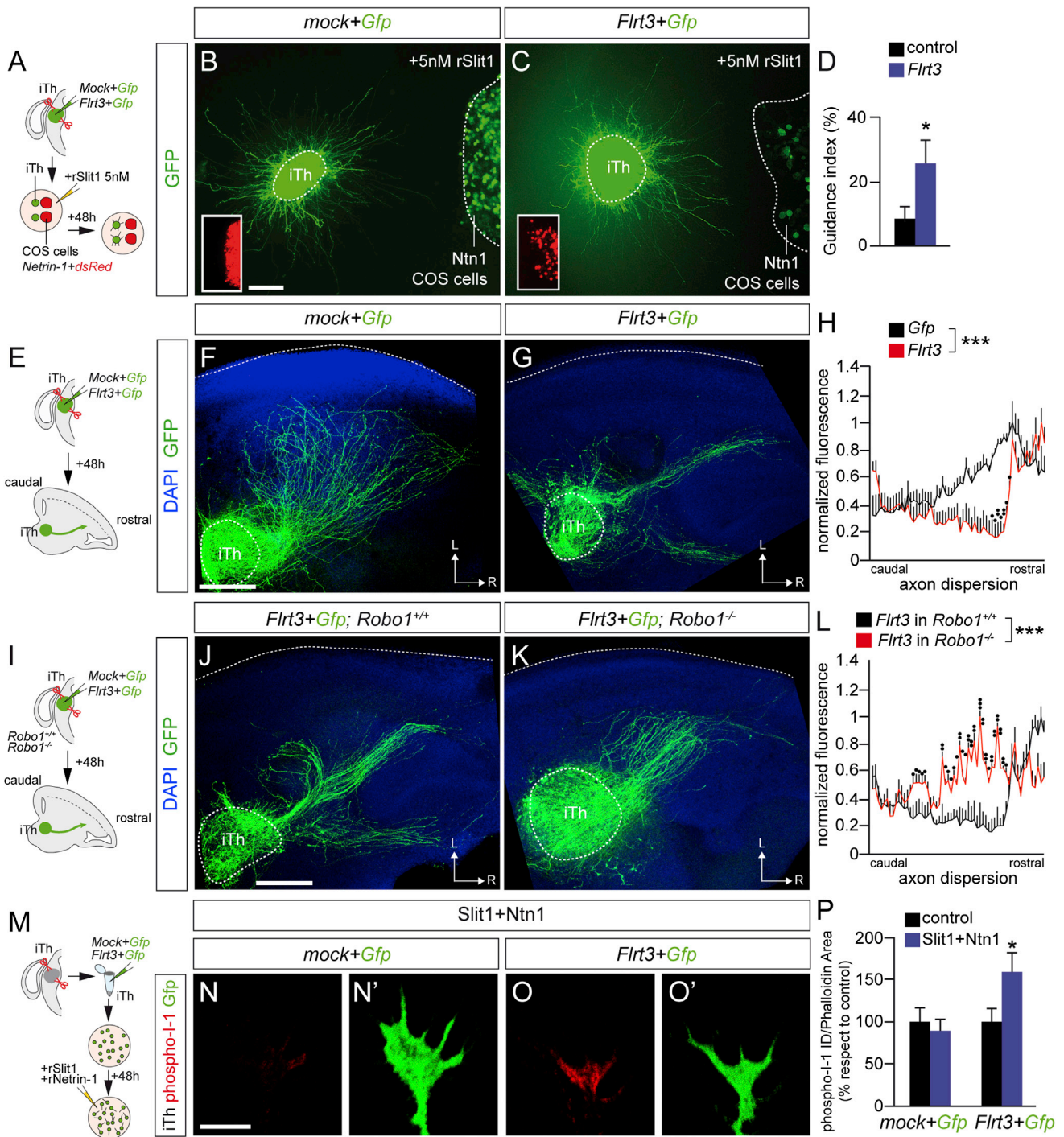


Figure 6. FLRT3 Expression Is Sufficient to Alter the Response to Netrin-1 in Robo1-Expressing Axons

(A) Experimental paradigm used to test the effect of *Flrt3* gain of function.
 (B and C) Explants electroporated with control cDNA grow symmetrically when confronted with Netrin-1-expressing COS7 cells in the presence of rSlit1 (B), whereas *Flrt3*-electroporated explants are attracted to this combined stimulus (C).
 (D) Quantification of the data represented in (B) and (C). $n = 19$ explants for mock electroporation; $n = 18$ explants for full-length *Flrt3* electroporation. * $p < 0.05$, two-tailed Student's *t* test.
 (E) Experimental paradigm used to test the role of FLRT3 in the navigation of iTCAs.
 (F and G) Control-electroporated iTCAs grow at rostro-intermediate positions into the ventral telencephalon of wild-type embryos (F), whereas *Flrt3*-electroporated iTCAs grow rostrally (G).
 (H) Quantification of the data represented in (F) and (G). $n = 6$ mock electroporated cocultures; $n = 6$ full-length *Flrt3* electroporated cocultures. *** $p < 0.001$ between distributions; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ between particular points, two-way ANOVA test.
 (I) Experimental paradigm used to test the role of FLRT3 in the navigation of iTCAs in the presence or absence of *Robo1*.

(legend continued on next page)

subtle and complex decisions and that probably involve other types of interactions between guidance cues, such as the permissive effect of Slit1 on Netrin-1 attraction. In this context, such an interaction would be important for the fine topographical sorting of axonal tracts.

Attraction in rTCAs correlates with an increase of DCC at the surface of the growth cone, suggesting that a certain threshold of DCC levels is necessary for the attractive response to Netrin-1. An alternative explanation is that Robo1-DCC interactions silence basal DCC activity, therefore preventing Netrin-1 from being attractive. Accordingly, we have found that Robo1 and DCC interact in thalamic neurons in basal conditions, that DCC-Robo1 immunostaining showed a high colocalization at the surface of rTCA growth cones, and that this colocalization was reduced after Slit1 plus Netrin-1 stimulation. However, when we confronted rTCA explants from either *Robo1* or the double *Robo1;Robo2* knockouts, we did not observe attraction toward Netrin-1, suggesting that DCC silencing is not the major mechanism.

FLRT3 Is a Context-Dependent Modulator of Axonal Responses

Context-dependent permissive interactions between axon-guidance cues, such as the case of NrCAM and GDNF proteins that modulate axon sensitivity to Sema3B in spinal cord axons [35, 36] or the switch of Sema6D activity from repulsive to attractive by NrCAM and plexin-A1 in retinal axons in vitro [37, 38], have already been shown. Therefore, whereas previous reports have suggested that the presence or absence of a coreceptor protein simply induces different downstream signals [39, 40], our study suggests that a coreceptor (FLRT3) changes the surface expression of an additional guidance receptor through promoting downstream signals that in turn convert the responses of axons. FLRT3 might switch Robo1 signaling to enable Netrin-1 attraction by upregulating the levels of DCC in the plasma membrane through PKA activity. Moreover, as we found that FLRT3 interacts in *cis* with the intracellular domain of Robo1 and that Slit1 repulsion is lost in *Robo2* mutants despite the presence of Robo1, our data also suggest that FLRT3 might be a potential modulator of Slit1/Robo1 repulsive responses triggered in rTCAs.

We found no evidence showing that FLRT3 modulates Netrin-1/DCC signaling directly because we did not detect significant binding of Netrin-1 to FLRT3, nor were we able to coimmunoprecipitate FLRT3 and DCC (data not shown). Moreover, we did not find that Slit1 binds directly to FLRT3 or that Slit1 changes the affinity of the Robo1-FLRT3 interaction (data not shown), leading us to consider the possibility that FLRT3 may be activated by an unknown ligand or that FLRT3 acts independently of a direct ligand, at least in this context. In this latter scenario, FLRT3 might simply modify the structure of the intracellular domain of Robo1, thereby altering its signaling profile. Consistent with such a model, we have

observed that the FLRT3-Robo1 interaction involves the cytoplasmic domain of Robo1 and that a large percentage of surface FLRT3 already colocalizes with Robo1 in rostral thalamic growth cones under basal conditions.

Our results showed that the Netrin-1 responsiveness involved in the topography of TCAs is determined by the expression and function of Robo1 and FLRT3. In the absence of FLRT3, such as in the case of wild-type iTCAs or rTCAs from *Flrt3* mutant mice, axons are not attracted to Netrin-1 in the corridor, so they target intermediate cortical regions. This ability depends on the presence of Robo1 receptor in these axons because the phenotype we found in *Robo1*^{-/-} mimics the one found in *Flrt3* mutants. Furthermore, the absence of either Slit1 or Netrin-1 ligands in the vTel causes a similar caudal shift of rostral thalamocortical projections in vivo [21, 41, 42].

In summary, FLRT3 appears to modulate several developmental processes such as cell growth, cell migration, and axon guidance by interacting in *cis* or in *trans* with distinct transmembrane receptors. In TCAs, FLRT3 modulates the degree of responsiveness to Netrin-1 from a neutral response to attraction. Thus, our study shows a novel mechanism that allows switches in axon responses as development proceeds, such that there is no need to have a prior set of specific axon-guidance receptors. Instead, by simply introducing FLRT3 into the equation, the response to a given cue can be changed in function of the environment.

Experimental Procedures

Mouse Strains

Wild-type mice maintained on a CD1 background were used for gene-expression analysis and for tissue culture experiments. *Robo1* and *Robo1;Robo2* double-mutant heterozygous mice [43–45] were maintained on a CD1 genetic background and crossed to produce homozygous embryos. *Robo2* heterozygous mice [43–45] were maintained on a C57Bl/6 genetic background and crossed to produce homozygous embryos. *Dcc* heterozygous mice [46] were maintained on a 129SV/SvPasCrl genetic background and crossed to produce homozygous embryos. The *FLRT3*^{gal} allele is a reporter/null allele in which the coding sequence of the *FLRT3* gene was replaced by the gene β -galactosidase [47]. The *FLRT3*^{lox} allele carries two loxP sites flanking the third exon, which includes the entire coding sequence of the *FLRT3* gene. This allele was successfully validated and published previously [15]. In the present study, *FLRT3*^{lox/lox} mice were crossed with the nervous-system-specific *Nestin*^{Cre} line [48], heterozygous for *FLRT3* (*FLRT3*^{gal/+}), in order to obtain knockout brains from *FLRT3*^{gal/lox}; *Nestin*^{Cre/+} embryos. *FLRT3*^{lox/lox} mice were also crossed with the inducible thalamic-specific *Gbx2*^{CreER} line [49], heterozygous for *FLRT3* (*FLRT3*^{lox/+}), in order to obtain brains from *FLRT3*^{lox/lox}; *Gbx2*^{CreER/+} embryos with the specific *FLRT3* deletion from the thalamus. The *Gbx2*^{CreER} line was provided by James Li (University of Connecticut Health Center). This line expresses *CreER(T2)-ires-EGfp* under the control of the *Gbx2* promoter. Tamoxifen induction of Cre recombination in *FLRT3*^{lox/lox}; *Gbx2*^{CreER/+} embryos was performed by gavage administration of 5 mg tamoxifen (Sigma) dissolved in corn oil (Sigma) at E10.5 and E13.5 to maximize recombination in rostral thalamic structures [49, 50] (H. Gezelius, N. Anton-Bolaños, and G.L.-B., unpublished data). In all cases, the day of vaginal plug was considered to

(J and K) *Flrt3*-electroporated iTCAs from *Robo1*^{+/+} embryos grow rostrally (J), whereas *Flrt3*-electroporated iTCAs grow at rostro-intermediate positions into the ventral telencephalon in the absence of *Robo1* (K).

(L) Quantification of the data represented in (J) and (K). n = 8 full-length *Flrt3* electroporated cocultures from *Robo1*^{+/+}; n = 6 full-length *Flrt3* electroporated cocultures from *Robo1*^{-/-}. ***p < 0.001 between distributions; *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 between particular points, two-way ANOVA test.

(M) Experimental paradigm used to test the PKA activity in FLRT3 overexpressing iTCAs.

(N–O) Phospho-I-1 staining of control-electroporated (N) or *Flrt3*-electroporated (O) E13.5 intermediate thalamic growth cones cultured for 48 hr when stimulated with rSlit1 (0.25 μ g/ml) plus rNetrin-1 (0.5 μ g/ml) for 20 min. GFP expression is shown in green.

(P) Quantification of the data represented in (N) and (O) and data not shown. n \geq 63 growth cones per condition. *p < 0.05, two-tailed Student's t test.

iTh, intermediate thalamus; rSlit1, recombinant Slit1 protein; ID, integrated density. The data are presented as mean + SEM. Scale bars represent 150 μ m (B and C), 300 μ m (F and G; J and K), and 5 μ m (N–O). See also Figure S6.

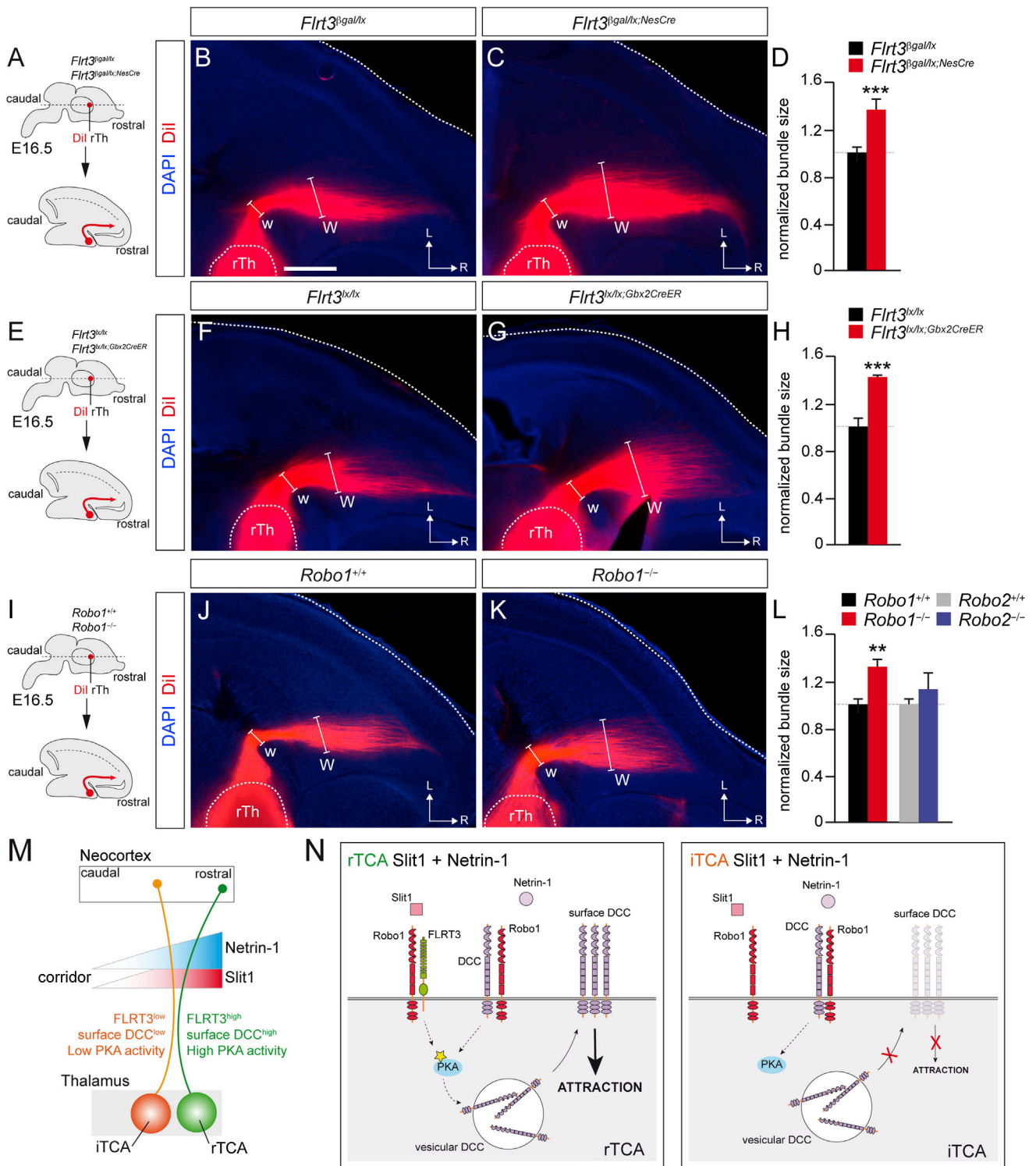


Figure 7. Abnormal Pathfinding of TCAs in the Absence of FLRT3 In Vivo

- (A) Experimental paradigm used to trace rTCAs in *Flrt3*^{βgal/lx} and *Flrt3*^{βgal/lx;NesCre} at E16.5 embryos.
 (B and C) Control (*Flrt3*^{βgal/lx}) rTCAs grow rostrally as a compact bundle (B), whereas they disperse to more intermediate regions of the vTel in *Flrt3*^{βgal/lx;NesCre} brains (C), as revealed by the width of the bundle within the subpallium (“W”) relative to its width at its entrance (“w”).
 (D) Quantification of the data represented in (B) and (C). n = 10 *Flrt3*^{βgal/lx} brains; n = 9 *Flrt3*^{βgal/lx;NesCre} brains. ***p < 0.001, two-tailed Student’s t test.
 (E) Experimental paradigm used to trace rTCAs in *Flrt3*^{lox/lx} and *Flrt3*^{lox/lx;Gbx2CreER} at E16.5 embryos.
 (F and G) *Flrt3*^{lox/lx} rTCAs grow rostrally as a compact bundle (F), whereas they disperse to more intermediate regions of the vTel in *Flrt3*^{lox/lx;Gbx2CreER} brains (G).
 (H) Quantification of the data represented in (F) and (G). n = 6 *Flrt3*^{lox/lx} brains; n = 6 *Flrt3*^{lox/lx;Gbx2CreER} brains. ***p < 0.001, two-tailed Student’s t test.
 (I) Experimental paradigm used to trace rTCAs in *Robo1*^{+/+} and *Robo1*^{-/-} at E16.5 embryos.

(legend continued on next page)

be E0.5. All animal procedures were approved by the Committee on Animal Research at the University Miguel Hernández, and they were carried out according to Spanish, German, and European Union regulations.

In Situ Hybridization, Immunohistochemistry, Enzymatic Staining, and Axonal Tracing

For in situ hybridization, the animals' brains were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS, and brain vibratome sections were collected (80 μ m thick, Leica Microsystems). In situ hybridization for *Flrt3* [47], *Slit1*, and *Netrin-1* [21] was performed using standard protocols [15].

For immunostaining, cultured cells and explants or slices were fixed in 4% PFA for 10 or 30 min, respectively. Immunostaining was performed on the following: dissociated thalamic neurons, thalamic explants in matrigel or collagen pads, and cultured slices. The following antibodies were used: mouse anti- β -III Tubulin 1/1,000 (Covance); goat anti-DCC 1/100, goat anti-FLRT3 1/100, goat anti-Robo2 1/50, goat anti-Unc5C 1/100 (R&D Systems); rabbit polyclonal antiserum against Robo1 1/1,000 (kindly provided by Fujio Murakami, Osaka University); rabbit anti-GFP 1/1,000 (Molecular Probes); chicken anti-GFP 1/3,000 (Aves Labs); rabbit anti-Robo1 1/100 (Novus Biologicals); rabbit anti-phospho-I-1 1/500 (Novus Biologicals); rabbit anti-Vamp2 1/200 (Millipore) and rabbit anti-Rab11 1/200 (Invitrogen). For surface DCC staining, anti-DCC antibody (R&D Systems) staining was carried out at 4°C for 20 min in a humidified chamber prior to fixation in 4% PFA at 4°C for 20 min. The absence of anti- β -III Tubulin staining was assessed in parallel to confirm that the cells were not inadvertently permeabilized at this step. Cultures were then permeabilized and F-actin was labeled with Phalloidin. The secondary antibodies used were as follows: Alexa Fluor 488-, 555-, and 647-conjugated goat or donkey anti-rabbit/mouse/goat (Molecular Probes 1:400). Alexa Fluor 488-, 568-Phalloidin (Molecular Probes), or Phalloidin-Atto 633 (Sigma) was applied together with the secondary antibodies.

To stain for β -galactosidase activity, E13.5 mouse brains were fixed for 1.5 hr in 0.2% glutaraldehyde and 1% PFA in PBS (containing 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, and 0.02% NP40), and they were then immersed in 25% sucrose/PBS solution overnight at 4°C. Cryosections (14 μ m) were stained for β -galactosidase activity by incubating them for 2–3 hr at 37°C in a 1 mg/ml X-gal solution (Invitrogen) containing 5 mM K₄Fe(CN)₆ and 5 mM K₃Fe(CN)₆. After rinsing, the samples were counterstained with FastRed (Vector Laboratories). For axonal tracing, the brains of embryos were fixed overnight in 4% PFA, and then small Dil crystals (1,1'-dioctadecyl 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes) were inserted into the rostral part of the thalamus after we hemidissected the brain. For double-labeling studies, small DiA crystals (4–4-dihexadecyl aminostyryl N-methyl-pyridinium iodide; Molecular Probes) were inserted into the intermediate part of the thalamus together with the Dil crystals. After the dyes were allowed to diffuse at 37°C, vibratome (100 μ m) brain sections were obtained and counterstained with DAPI (Sigma), a fluorescent nuclear dye.

Thalamic Explants in Collagen or Matrigel

COS7 cells were transfected (FuGene HD, Promega) with expression vectors encoding the following proteins: human Slit1 [51], Netrin-1 [52], Gfp, or dsRed [53]. Aggregates were prepared by diluting the transfected cells in Matrigel (BD Biosciences) as described previously [53]. Thalamic explants were confronted with COS7 cells and embedded in rat tail collagen (BD Bioscience), except when confrontation assays were performed after slice electroporation in which Matrigel was used (BD Bioscience). Then explants were cultured for up to 48 hr in Neurobasal medium supplemented with B-27, 25 mM glucose, 2 mM glutamine, and 100 U/ml pen-strep (Invitrogen). Recombinant Slit1 (5 nM; R&D Systems), FLRT3-ECD [15] (1 μ g/ml), a mouse anti-DCC antibody (AF5 clone; Abcam), or control mouse IgG was

added to the culture media as indicated. After fixation in 4% PFA, axons were labeled using the mouse anti- β -III Tubulin antibody (Covance).

Slice Cocultures and In Vitro Focal Electroporation

Organotypic slice cultures of the embryonic mouse telencephalon were prepared and maintained for 48 hr, as previously described [53]. Telencephalic-receiving slices were cut at an angle of 45° between the horizontal and sagittal planes, while thalamic explants were dissected out from coronal slices previously subjected to focal electroporation, performed as described elsewhere [53]. The following DNA plasmids were used for electroporation at a concentration of 1.2 μ g/ μ l: *FLRT3-IRES-Gfp* and the empty vector. All the plasmids were coelectroporated with a plasmid encoding *Gfp* at 0.9 μ g/ μ l and mixed with 1% fast green (Sigma). Cocultures were maintained for 48 hr in Slice Culture Medium (SCM: 69% Basal Medium Eagle, 25% Hank's balanced salt solution [HBSS], 5% Normal Horse Serum, 50 mM glucose, 2 mM glutamine, and 100 U/ml pen-strep), and the dispersion of thalamic axons along the rostro-caudal axis was quantified by plotting with ImageJ software.

Collapse Assays

Dissociated thalamic cultures from E13.5 thalamus were performed as described previously [54]. After 48 hr of culture, neurons were incubated with 1 μ g/ml Slit1 or PBS (control) for 30 min at 37°C, fixed, and labeled with Alexa Fluor 488-Phalloidin (1/500, Invitrogen) to analyze growth cone morphologies. Collapsed growth cones were scored as shown previously [15].

Western Blot and Immunoprecipitation

Neuron cultures were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 1% Triton X-100) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche). Protein lysates were clarified by centrifugation at 1,000 \times g for 10 min. For immunoprecipitations, 200–400 μ g of total protein lysates were diluted to 400 μ l with lysis buffer and precleared for 1 hr at 4°C on gentle rotation with 150 μ l of a protein G Sepharose bead slurry (50%, Sigma). Precleared lysates were incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody (1 μ g goat anti-Robo1, 1 μ g goat anti-FLRT3; R&D Systems) and then for 3 hr with 40 μ l of the protein G Sepharose bead slurry (50%). The beads were washed three times with lysis buffer and resuspended in SDS loading buffer. The protein extracts or immunoprecipitates were resolved on 8%–12% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Protran, Whatman). The membranes were then blocked for 45 min at room temperature with 5% nonfat powdered milk in Tris-buffered saline Tween-20 (TBS-T: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl [pH 7.4], 0.05% Tween-20) and probed overnight at 4°C with the following primary antibodies: goat anti-Robo1 1/200, goat anti-Robo2 1/200, goat anti-Unc5C 1/200, goat anti-FLRT3 1/1,000, goat anti-DCC 1/500 (R&D Systems), rabbit anti-phospho-(Ser/Thr) PKA substrate 1/2,000 (Cell Signaling Technology), or mouse anti- β -III tubulin 1/20,000 (Covance). The membranes were then incubated with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Sigma), and antibody binding was visualized by chemiluminescence (Immobilon Western, Millipore) in a Luminescent Image Analyzer LAS-1,000 Plus (Fujifilm).

Surface Biotinylation

After 2 days in vitro, thalamic neurons were treated as indicated and incubated for 20 min at 37°C during the treatments. The cells were washed twice with ice-cold PBS containing MgCl₂ and CaCl₂ (PBS⁺; Sigma), and the cells were then incubated with 0.5 mg/ml EZ-Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Scientific) diluted in PBS⁺ at 4°C for 30 min. Excess biotin was quenched by washing it off three times for 5 min each in PBS⁺ with 50 mM NH₄Cl. Finally,

(J and K) *Robo1*^{+/+} rTCAs grow rostrally as a compact bundle (J), whereas they disperse to more intermediate regions of the vTel in *Robo1*^{-/-} brains (K). (L) Quantification of the data represented in (J) and (K). rTCA dispersion at the vTel is normal in *Robo2*^{-/-} brains. $n \geq 6$ brains per condition. ** $p < 0.01$, two-tailed Student's t test.

(M) Scheme representing the topographic guidance of rTCAs and iTCAs in the ventral telencephalon. Corridor cells express overlapping gradients of Slit1 and Netrin-1 [21]. The rostral positioning of rTCAs relies on the specific expression and function of FLRT3 in these axons that, via PKA, increase surface DCC levels through the Slit1/Robo1 interaction, thereby enabling Netrin-1 attraction. The topographic arrangement of iTCAs depends on the repulsive activity of Slit1, and, thus, it is independent of FLRT3.

(N) Scheme representing the mechanism by which responsiveness to Netrin-1 is achieved in TCAs. Only the combination of Slit1 plus Netrin-1 can activate a downstream intracellular cascade in rTCAs that activates PKA, thereby producing an increase in surface DCC expression by activating vesicular transport, ultimately favoring Netrin-1 attraction. This mechanism requires Robo1 and FLRT3 receptor activation, and it is not triggered in iTCAs because they do not express FLRT3.

rTh, rostral thalamus. The data are presented as mean + SEM. Scale bar represents 300 μ m. See also Figure S7.

the cells were washed twice with cold PBS⁺, lysed in biotinylation lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1.25% Triton X-100, 0.25% SDS, and 5 mg/ml iodoacetamide), and supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). Immunoprecipitations were performed with high-capacity NeutrAvidin resin (Thermo Scientific). Samples were examined in western blots as described.

Quantification of the Growth of Axons in Collagen or Matrigel Pads

Explants were subdivided into four sectors, and the guidance effect was quantified by calculating the P/D ratio for each explant, where P and D represent the length of the 40 longest axons (measured with ImageJ software) extending into the quadrants that are proximal and distal to the COS7 cell aggregate, respectively. Once the mean P/D ratio for each condition was determined, a guidance index was calculated for each condition as previously described [21]. Student's t test was used for the comparisons between conditions.

Supplemental Information

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures and seven figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.042>.

Acknowledgments

We thank Imma Montoliu, Cristina Merino, and Luis Rodríguez for their outstanding technical assistance. We are grateful to Oscar Marín for advice and critical reading of the manuscript. We are also grateful to members of the López-Bendito and E. Herrera laboratories for the stimulating discussions and comments. E.L.-D. is supported by a CONSOLIDER fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). E.L.-D. held a short-term European Molecular Biology Organization (EMBO) mobility fellowship. D.d.T. was funded by an EMBO long-term fellowship. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB870 to R.K.), the Spanish MICINN (BFU2010-18055 to J.E. and BFU2012-34298 to G.L.-B.), FP7-PEOPLE-2011-CIG (PCIG9-GA-2011-293980 to J.E.), the CONSOLIDER programme CSD2007-00023, and an ERC grant (ERC-2009-StG_20081210 to G.L.-B.). J.E. is a Ramón y Cajal investigator (RYC-2008-03342). G.L.-B. is an EMBO Young Investigator.

Received: December 16, 2013

Revised: January 10, 2014

Accepted: January 10, 2014

Published: February 20, 2014

References

- O'Donnell, M., Chance, R.K., and Bashaw, G.J. (2009). Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. *Annu. Rev. Neurosci.* **32**, 383–412.
- Bradford, D., Cole, S.J., and Cooper, H.M. (2009). Netrin-1: diversity in development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 487–493.
- Round, J., and Stein, E. (2007). Netrin signaling leading to directed growth cone steering. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 15–21.
- Williams, M.E., Wu, S.C., McKenna, W.L., and Hinck, L. (2003). Surface expression of the netrin receptor UNC5H1 is regulated through a protein kinase C-interacting protein/protein kinase-dependent mechanism. *J. Neurosci.* **23**, 11279–11288.
- Bartoe, J.L., McKenna, W.L., Quan, T.K., Stafford, B.K., Moore, J.A., Xia, J., Takamiya, K., Hugarin, R.L., and Hinck, L. (2006). Protein interacting with C-kinase 1/protein kinase Calpha-mediated endocytosis converts netrin-1-mediated repulsion to attraction. *J. Neurosci.* **26**, 3192–3205.
- Bouchard, J.F., Moore, S.W., Tritsch, N.X., Roux, P.P., Shekarabi, M., Barker, P.A., and Kennedy, T.E. (2004). Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an intracellular pool: A novel mechanism regulating commissural axon extension. *J. Neurosci.* **24**, 3040–3050.
- Moore, S.W., and Kennedy, T.E. (2006). Protein kinase A regulates the sensitivity of spinal commissural axon turning to netrin-1 but does not switch between chemoattraction and chemorepulsion. *J. Neurosci.* **26**, 2419–2423.
- Bonanomi, D., Chivatakarn, O., Bai, G., Abdesslem, H., Lettieri, K., Marquardt, T., Pierchala, B.A., and Pfaff, S.L. (2012). Ret is a multifunctional coreceptor that integrates diffusible- and contact-axon guidance signals. *Cell* **148**, 568–582.
- Hao, J.C., Adler, C.E., Mebane, L., Gertler, F.B., Bargmann, C.I., and Tessier-Lavigne, M. (2010). The tripartite motif protein MADD-2 functions with the receptor UNC-40 (DCC) in Netrin-mediated axon attraction and branching. *Dev. Cell* **18**, 950–960.
- Ly, A., Nikolaev, A., Suresh, G., Zheng, Y., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (2008). DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1. *Cell* **133**, 1241–1254.
- Karaulanov, E., Böttcher, R.T., Stanek, P., Wu, W., Rau, M., Ogata, S., Cho, K.W., and Niehrs, C. (2009). Unc5B interacts with FLRT3 and Rnd1 to modulate cell adhesion in Xenopus embryos. *PLoS ONE* **4**, e5742.
- Söllner, C., and Wright, G.J. (2009). A cell surface interaction network of neural leucine-rich repeat receptors. *Genome Biol.* **10**, R99.
- O'Sullivan, M.L., de Wit, J., Savas, J.N., Comoletti, D., Otto-Hitt, S., Yates, J.R., 3rd, and Ghosh, A. (2012). FLRT proteins are endogenous latrophilin ligands and regulate excitatory synapse development. *Neuron* **73**, 903–910.
- Böttcher, R.T., Pollet, N., Delius, H., and Niehrs, C. (2004). The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling. *Nat. Cell Biol.* **6**, 38–44.
- Yamagishi, S., Hampel, F., Hata, K., Del Toro, D., Schwark, M., Kvachnina, E., Bastmeyer, M., Yamashita, T., Tarabykin, V., Klein, R., and Egea, J. (2011). FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons. *EMBO J.* **30**, 2920–2933.
- Dudanova, I., and Klein, R. (2013). Integration of guidance cues: parallel signaling and crosstalk. *Trends Neurosci.* **36**, 295–304.
- Fothergill, T., Donahoe, A.L., Douglass, A., Zalucki, O., Yuan, J., Shu, T., Goodhill, G.J., and Richards, L.J. (2013). Netrin-DCC signaling regulates corpus callosum formation through attraction of pioneering axons and by modulating Slit2-mediated repulsion. *Cereb. Cortex*. Published online January 17, 2013. <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhs395>.
- Stein, E., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**, 1928–1938.
- Evans, T.A., and Bashaw, G.J. (2010). Axon guidance at the midline: of mice and flies. *Curr. Opin. Neurobiol.* **20**, 79–85.
- López-Bendito, G., and Molnár, Z. (2003). Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 276–289.
- Bielle, F., Marcos-Mondéjar, P., Leyva-Díaz, E., Lokmane, L., Mire, E., Mailhes, C., Keita, M., García, N., Tessier-Lavigne, M., Garel, S., and López-Bendito, G. (2011). Emergent growth cone responses to combinations of Slit1 and Netrin 1 in thalamocortical axon topography. *Curr. Biol.* **21**, 1748–1755.
- Sann, S., Wang, Z., Brown, H., and Jin, Y. (2009). Roles of endosomal trafficking in neurite outgrowth and guidance. *Trends Cell Biol.* **19**, 317–324.
- Han, J., Han, L., Tiwari, P., Wen, Z., and Zheng, J.Q. (2007). Spatial targeting of type II protein kinase A to filopodia mediates the regulation of growth cone guidance by cAMP. *J. Cell Biol.* **176**, 101–111.
- Yam, P.T., Kent, C.B., Morin, S., Farmer, W.T., Alchini, R., Lepelletier, L., Colman, D.R., Tessier-Lavigne, M., Fournier, A.E., and Charron, F. (2012). 14-3-3 proteins regulate a cell-intrinsic switch from sonic hedgehog-mediated commissural axon attraction to repulsion after midline crossing. *Neuron* **76**, 735–749.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* **87**, 175–185.
- Chédotal, A. (2007). Slits and their receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **621**, 65–80.
- Ypsilanti, A.R., Zagar, Y., and Chédotal, A. (2010). Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* **137**, 1939–1952.
- Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J.R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M.M., and Hong, K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* **423**, 990–995.
- Shelly, M., Lim, B.K., Cancedda, L., Heilshorn, S.C., Gao, H., and Poo, M.M. (2010). Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science* **327**, 547–552.
- Tojima, T., Akiyama, H., Itofusa, R., Li, Y., Katayama, H., Miyawaki, A., and Kamiguchi, H. (2007). Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat. Neurosci.* **10**, 58–66.

31. Moore, S.W., Correia, J.P., Lai Wing Sun, K., Pool, M., Fournier, A.E., and Kennedy, T.E. (2008). Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1. *Development* 135, 2855–2864.
32. Hall, A., and Lalli, G. (2010). Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001818.
33. Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Marillat, V., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., and Chédotal, A. (2001). Sensory axon response to substrate-bound Slit2 is modulated by laminin and cyclic GMP. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 1048–1058.
34. Chalasani, S.H., Sabelko, K.A., Sunshine, M.J., Littman, D.R., and Raper, J.A. (2003). A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *J. Neurosci.* 23, 1360–1371.
35. Charoy, C., Nawabi, H., Reynaud, F., Derrington, E., Bozon, M., Wright, K., Falk, J., Helmbacher, F., Kindbeiter, K., and Castellani, V. (2012). *gdnf* activates midline repulsion by Semaphorin3B via NCAM during commissural axon guidance. *Neuron* 75, 1051–1066.
36. Nawabi, H., Briancçon-Marjollet, A., Clark, C., Sanyas, I., Takamatsu, H., Okuno, T., Kumanogoh, A., Bozon, M., Takeshima, K., Yoshida, Y., et al. (2010). A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes Dev.* 24, 396–410.
37. Williams, S.E., Grumet, M., Colman, D.R., Henkemeyer, M., Mason, C.A., and Sakurai, T. (2006). A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. *Neuron* 50, 535–547.
38. Kuwajima, T., Yoshida, Y., Takegahara, N., Petros, T.J., Kumanogoh, A., Jessell, T.M., Sakurai, T., and Mason, C. (2012). Optic chiasm presentation of Semaphorin6D in the context of Plexin-A1 and Nr-CAM promotes retinal axon midline crossing. *Neuron* 74, 676–690.
39. Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Chauvet, S., and Mann, F. (2010). VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron* 66, 205–219.
40. Falk, J., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., Püschel, A.W., et al. (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48, 63–75.
41. Braisted, J.E., Catalano, S.M., Stimac, R., Kennedy, T.E., Tessier-Lavigne, M., Shatz, C.J., and O’Leary, D.D. (2000). Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J. Neurosci.* 20, 5792–5801.
42. Powell, A.W., Sassa, T., Wu, Y., Tessier-Lavigne, M., and Polleux, F. (2008). Topography of thalamic projections requires attractive and repulsive functions of Netrin-1 in the ventral telencephalon. *PLoS Biol.* 6, e116.
43. Grieshammer, U., Le Ma, Plump, A.S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., and Martin, G.R. (2004). SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev. Cell* 6, 709–717.
44. Long, H., Sabatier, C., Ma, L., Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D.M., Tamada, A., Murakami, F., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (2004). Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42, 213–223.
45. Ma, L., and Tessier-Lavigne, M. (2007). Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *J. Neurosci.* 27, 6843–6851.
46. Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R.V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (*Dcc*) gene. *Nature* 386, 796–804.
47. Egea, J., Erlacher, C., Montanez, E., Burtscher, I., Yamagishi, S., Hess, M., Hampel, F., Sanchez, R., Rodriguez-Manzanique, M.T., Bösl, M.R., et al. (2008). Genetic ablation of FLRT3 reveals a novel morphogenetic function for the anterior visceral endoderm in suppressing mesoderm differentiation. *Genes Dev.* 22, 3349–3362.
48. Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., and Schütz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* 23, 99–103.
49. Chen, L., Guo, Q., and Li, J.Y. (2009). Transcription factor Gbx2 acts cell-nonautonomously to regulate the formation of lineage-restriction boundaries of the thalamus. *Development* 136, 1317–1326.
50. Li, K., Zhang, J., and Li, J.Y. (2012). Gbx2 plays an essential but transient role in the formation of thalamic nuclei. *PLoS ONE* 7, e47111.
51. Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96, 795–806.
52. Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409–424.
53. López-Bendito, G., Cautinat, A., Sánchez, J.A., Bielle, F., Flames, N., Garratt, A.N., Talmage, D.A., Role, L.W., Charnay, P., Marín, O., and Garel, S. (2006). Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125, 127–142.
54. Mire, E., Mezzera, C., Leyva-Díaz, E., Paternain, A.V., Squarzon, P., Bluy, L., Castillo-Paterna, M., López, M.J., Peregrín, S., Tessier-Lavigne, M., et al. (2012). Spontaneous activity regulates Robo1 transcription to mediate a switch in thalamocortical axon growth. *Nat. Neurosci.* 15, 1134–1143.

Current Biology, Volume 24

Supplemental Information

**FLRT3 Is a Robo1-Interacting Protein
that Determines Netrin-1 Attraction
in Developing Axons**

**Eduardo Leyva-Díaz, Daniel del Toro, Maria José Menal, Serafi Cambray, Rafael Susín,
Marc Tessier-Lavigne, Rüdiger Klein, Joaquim Egea, and Guillermina López-Bendito**

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Figures

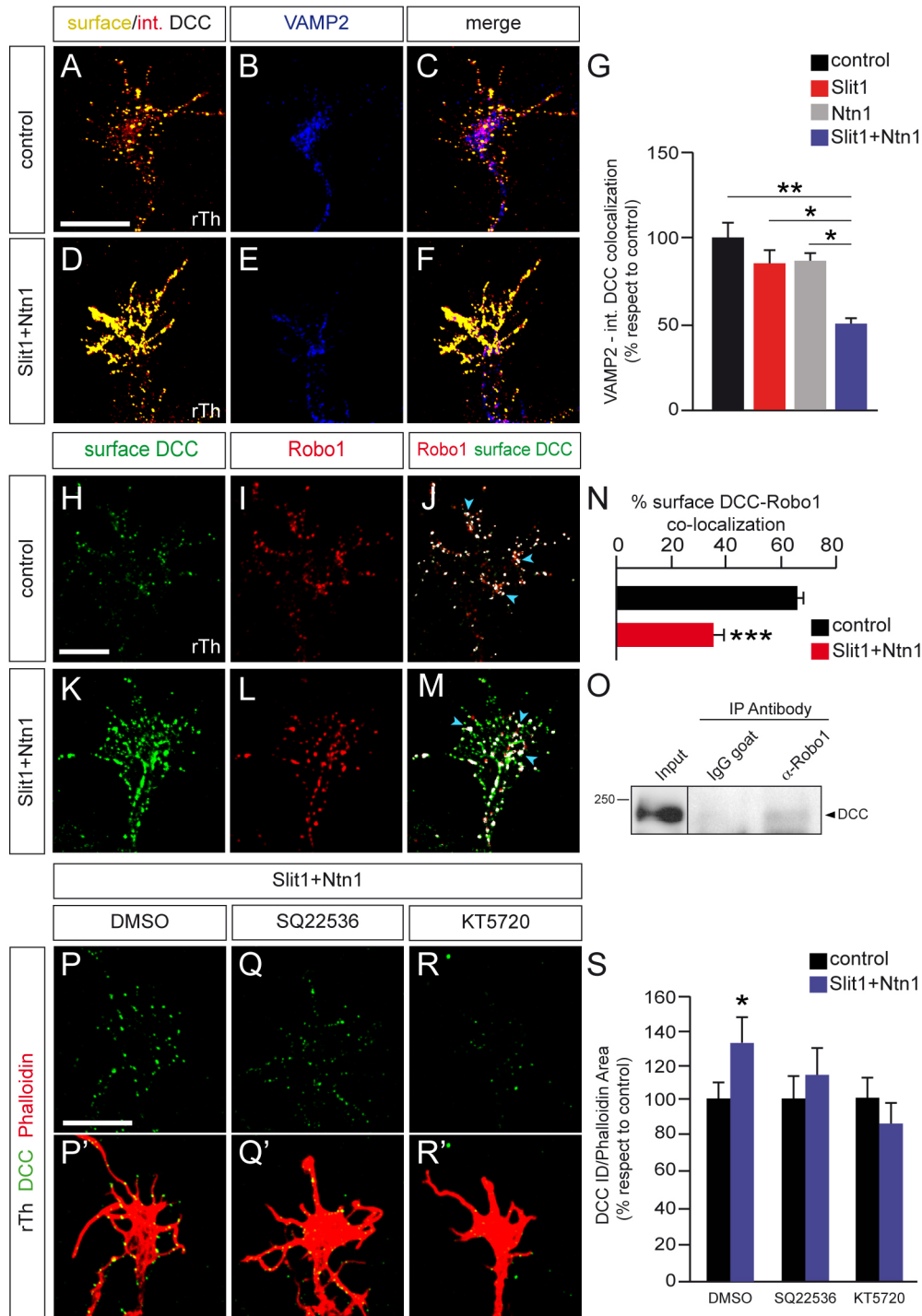


Figure S1. PKA activation is necessary for the upregulation of surface DCC and Robo1 and DCC interact under basal conditions

(A-F) Surface DCC (yellow) and total DCC immunostainings merge reveals the corresponding pixels to internal DCC (red on A and D), which co-localize with VAMP2 (blue) immunostaining (magenta pixels on C and F), on rostral thalamic growth cones stimulated (D-F) or not (A-C) with 0.25 $\mu\text{g/ml}$ Slit1 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Netrin-1 for 20 min.

(G) Quantification of the data represented in A-F. $n \geq 63$ growth cones per condition; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, one-way ANOVA test with Tukey's post hoc analysis.

(H-M) Co-localization of surface DCC (green) and Robo1 (red) immunostaining in rostral thalamic growth cones (arrowheads shown in J and M). DCC surface staining was followed by Robo1 staining.

(N) Quantification of the data represented in J and M under basal conditions and after stimulation with Slit1 plus Netrin-1 combination. $n = 106$ control growth cones, $n = 88$ stimulated growth cones. *** $p < 0.001$, two-tailed Student's t-test.

(O) Co-immunoprecipitation of Robo1 and DCC in basal conditions in thalamic neurons.

(P-R') DCC surface immunostaining on non-permeabilized rostral thalamic growth cones cultured for 48h before treatment for 15 min with 1 mM SQ22536 (Q) or 200 nM KT5720 (R). Netrin-1 plus Slit1 recombinant proteins were then added for 20 min. The treatment with the inhibitors abolished the increase on surface DCC levels compared with the control condition (DMSO; P).

(S) Quantification of the data represented in P-R. $n \geq 66$ growth cones per condition; * $p < 0.05$, two-tailed Student's t-test.

rTh, rostral thalamus; ID, integrated density. The data are presented as the mean + SEM. Scale bars represent 10 μm .

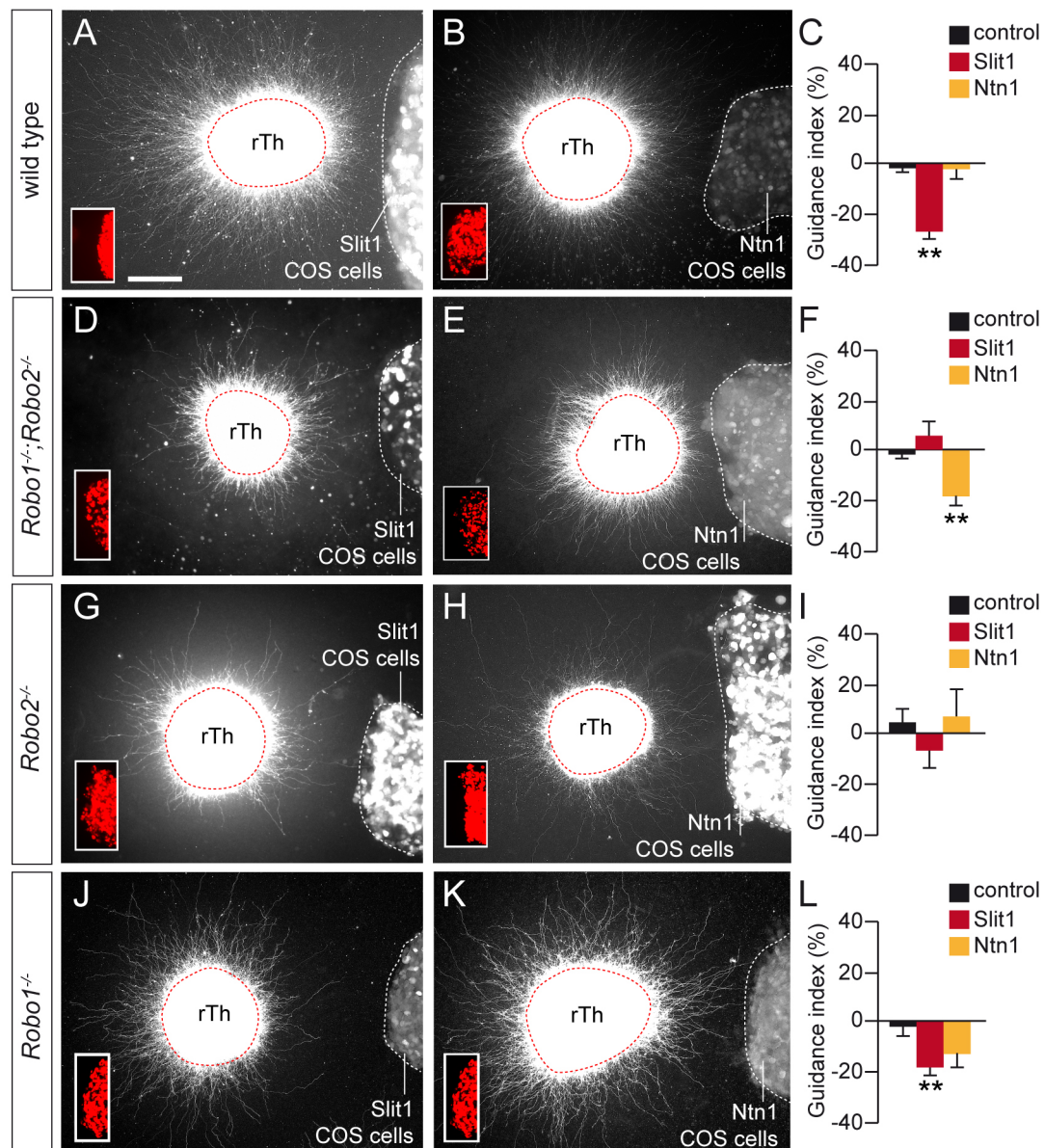


Figure S2. Slit1 repulsion is lost in the absence of *Robo2*

(A and B) Wild type rTCA are repelled when confronted with Slit1-expressing COS7 cells (A) whereas explants confronted with Netrin-1 alone grow symmetrically (B).

(C) Quantification of the data represented in A, B and data not shown. $n \geq 14$ explants per condition. $**p < 0.01$, one-way ANOVA test with Tukey's post hoc analysis.

(D and E) *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} rTCA are not repelled when confronted with Slit1-expressing COS7 cells (D), whereas explants confronted with Netrin-1 alone are repelled (E).

(F) Quantification of the data represented in D, E and data not shown. $n \geq 12$ explants per condition. $**p < 0.01$, one-way ANOVA test with Tukey's post hoc analysis.

(G and H) *Robo2*^{-/-} rTCA are not repelled when confronted with Slit1-expressing COS7 cells (G), whereas explants confronted with Netrin-1 alone grow symmetrically (H).

(I) Quantification of the data represented in G, H and data not shown. $n \geq 7$ explants per condition.

(J and K) *Robo1*^{-/-} rTCA are repelled when confronted with Slit1-expressing COS7 cells (J), whereas explants confronted with Netrin-1 alone grow symmetrically (K).

(L) Quantification of the data represented in J, K and data not shown. $n \geq 19$ explants per condition. $**p < 0.01$, one-way ANOVA test with Tukey's post hoc analysis.

rTh, rostral thalamus; rSlit1, recombinant Slit1 protein. The data are presented as the mean + SEM. Scale bar represents 150 μm .

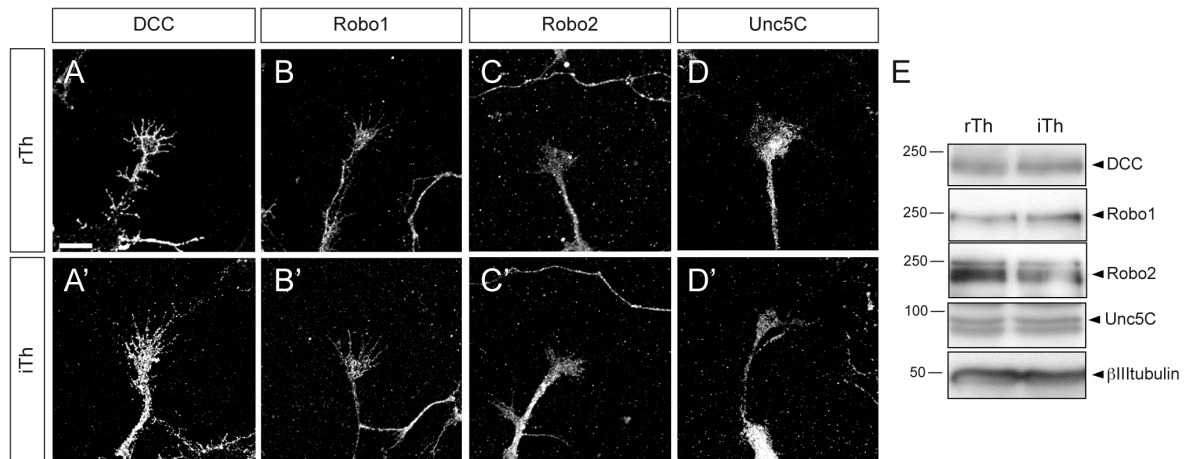


Figure S3. Slit and Netrin receptor expression in thalamic axons

(A-D') DCC (A,A'), Robo1 (B,B'), Robo2 (C,C') and Unc5C (D,D') immunocytochemistry in E13.5 rostral and intermediate thalamic growth cones after two days *in vitro*. (E) Western blot showing the Netrin-1 and Slit guidance receptors in neuronal lysates from rostral and intermediate regions of the thalamus. rTh, rostral thalamus; iTh, intermediate thalamus. Scale bar represents 10 μ m.

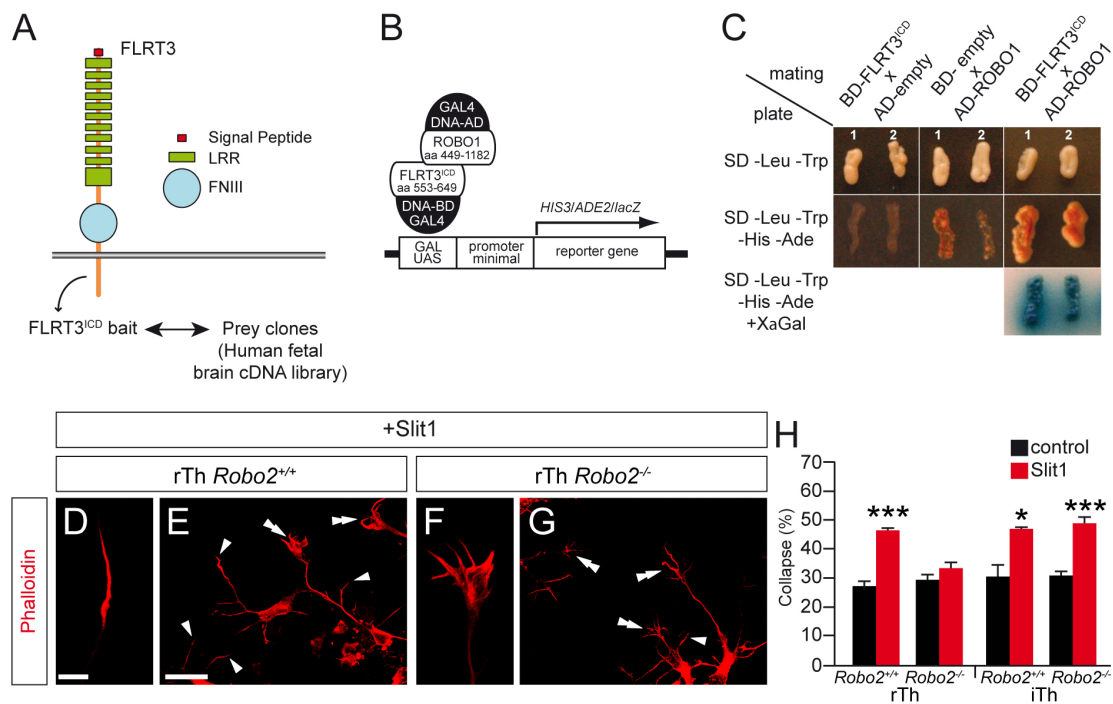


Figure S4. Robo1-FLRT3 interaction by yeast-two hybrid and effects on Robo1 repulsion

(A) The intracellular domain of the mouse FLRT3 (amino acids 553-649) was used as bait in a yeast two-hybrid screen to probe a human fetal brain cDNA library in order to identify intracellular interacting proteins.

(B) Of the positive clones, one encoded the Robo1 protein (amino acids 449-1182).

(C) Yeast mating experiment between the indicated yeast strains showing the growth of two independent diploid colonies (1 and 2) for each mating. All diploids grew well in SD plates without the auxotrophies provided by the bait (Trp) and the library vector (Leu: upper images). However, without His and Ade, only diploids expressing FLRT3^{ICD}-BD and Robo1-AD could grow due to the activation of reporter gene expression (lower images). These diploids were positive for a third reporter gene (*lacZ*: lower row, +XαGal).

(D-G) E13.5 dissociated rostral thalamic neurons from *Robo2*^{+/+} or *Robo2*^{-/-} brains were evaluated for growth cone collapse in the presence of recombinant Slit1 (1 μg/ml). Phalloidin staining shows the collapsed morphology of growth cones (D, arrowheads) in the *Robo2*^{+/+} cultures or the complex morphology (F, double arrowheads) in *Robo2*^{-/-} cultures. Addition of recombinant Slit1 significantly increased rostral thalamic growth cone collapse in *Robo2*^{+/+} cultures (D and E) compared with controls, but not on *Robo2*^{-/-} cultures (F and G).

(H) Quantification of the data represented in D-G and data not shown. The results are reported as the percentage of growth cones collapsing in response to recombinant Slit1 or PBS (control). $n \geq 556$ growth cones scored per condition. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, two-tailed Student's t-test.

ICD, intracellular domain; LRR, leucine-rich repeat; FNIII, fibronectin type III; BD, Binding Domain; AD, Activator Domain; SD, Synthetic defined medium; rTh, rostral thalamus; iTh, intermediate thalamus. Scale bars represent 5 μm (D and F) and 20 μm (E and G).

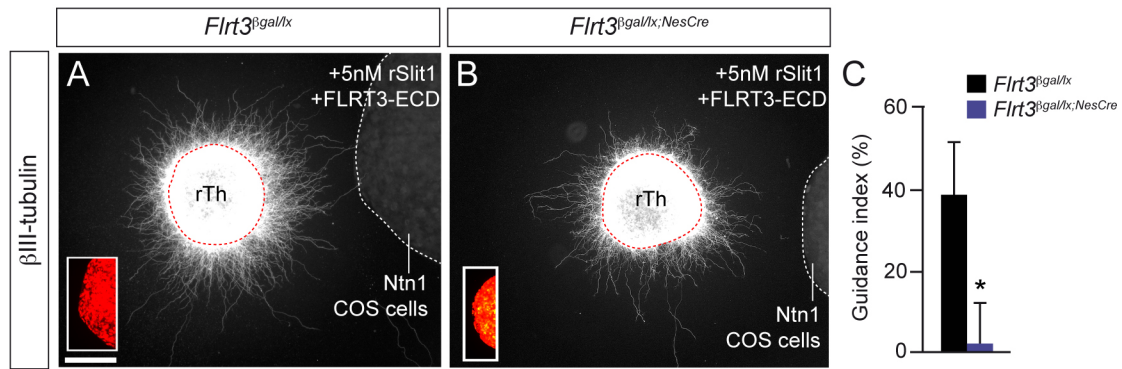


Figure S5. The FLRT3 extracellular domain is not important for Netrin-1 attraction

(A and B) Addition of FLRT3-ECD (1 μ g/ml) to rostral explants confronted with Netrin-1-expressing COS7 cells in the presence of rSlit1 did not affect the attractive response in control axons (*Flrt3^{βgal/lx}*; A) and did not rescue this behavior in conditional *Flrt3^{βgal/lx;NesCre}* rostral axons (B).

(C) Quantification of the data represented in A and B. $n = 7$ explants for *Flrt3^{βgal/lx}*, $n = 9$ explants for *Flrt3^{βgal/lx;NesCre}*. * $p < 0.05$, two-tailed Student's t-test.

rTh, rostral thalamus; rSlit1, recombinant Slit1 protein; ECD, extracellular domain. The data are presented as the mean + SEM. Scale bar represents 150 μ m.

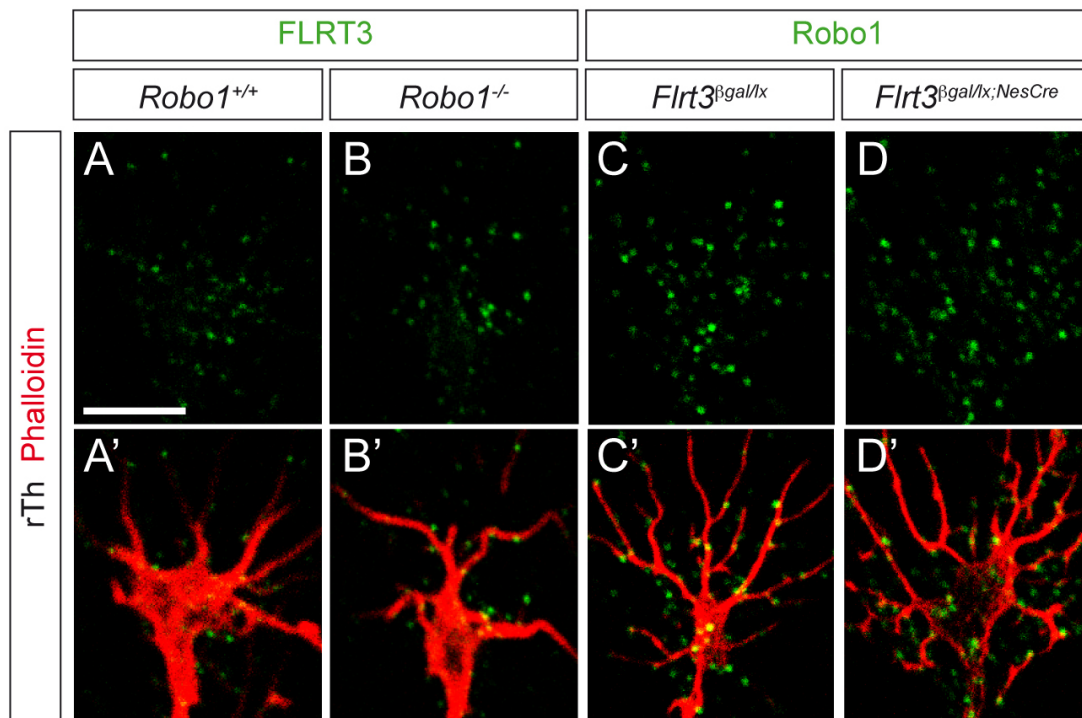


Figure S6. Neither Robo1 nor FLRT3 expression differ in *Robo1* or *Flrt3* mutant mice, respectively

(A-B') FLRT3 immunostaining of non-permeabilized *Robo1*^{+/+} and *Robo1*^{-/-} growth cones from E13.5 rostral cultured thalamic neurons.

(C-D') Robo1 immunostaining of *Flrt3*^{βgal/lx} and *Flrt3*^{βgal/lx;NesCre} growth cones from E13.5 rostral cultured thalamic neurons.

iTh, intermediate thalamus. Scale bar represents 10 μm.

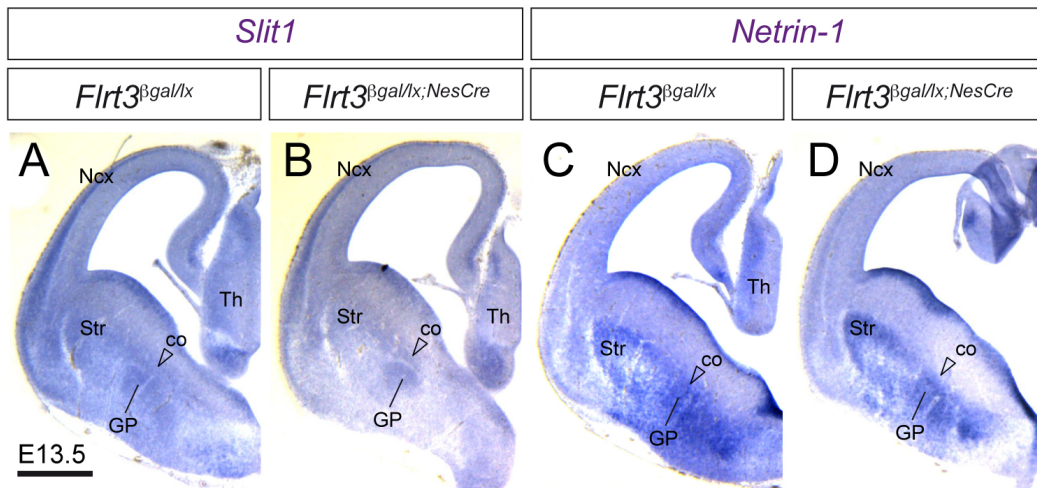


Figure S7. *Slit1* and *Netrin-1* expression patterns in *Flrt3* mutant mice

(A-D) Serial coronal sections through the telencephalon of E13.5 *Flrt3* ^{β gal/lx} and *Flrt3* ^{β gal/lx;NesCre} embryos showing equal *Slit1* (A and B) and *Netrin-1* (C and D) expression patterns in the telencephalon of control (A and C) and mutant (B and D) mice as assessed by *in situ* hybridization.

Str, striatum; Ncx, neocortex; GP, globus pallidus; co, corpus callosum; Th, thalamus. Scale bar represents 500 μ m.

Supplemental Experimental Procedures

Yeast two-hybrid screen

The Yeast Two-Hybrid screen was performed using the intracellular domain (ICD) of FLRT3 (amino acids 553-649) as the bait and a human fetal brain cDNA library as the prey, according to the manufacturer's instructions (Clontech, protocol No. PT3183-1, version No. PR6Y2132). The bait vector contained the TRP1 gene and expressed the FLRT3-ICD as a fusion protein with Gal4 DNA-BD in the yeast strain AH109 (MAT α). The expression of this fusion protein in AH109 was not toxic and nor did it transactivate reporter genes. The pre-transformed library was expressed with Gal4 AD in the Y187 (MAT α) yeast strain in a vector containing the LEU2 gene. The bait and library strains were mated overnight at 30°C in complete growing media and interactions were detected by the transcription of the four reporter genes: HIS3, ADE2, MEL1 and LacZ. Accordingly, diploids were first plated at 30°C in SD plates -Trp, -Leu, -Ade and -His, and the growing colonies were streaked on SD plates -Ade, -His, -Trp, -Leu, +X α Gal to confirm the positive interaction. In order to determine which proteins interacted with FLRT3-ICD, we first extracted the DNA from the yeast and we then amplified the cDNA from the Library using the following primers: forward 5' CTATTCGATGATGAAGATACC 3' and reverse 5' AGATGGTGCACGATGCACAG 3'. Finally the PCR products were sequenced. One of these clones contained the ROBO1 gene (amino acid 449-1182) in frame with GAL4 AD.

Co-immunoprecipitation and co-localization assays in HEK293T

For co-immunoprecipitation assays, HEK293T cells were co-transfected with the appropriate combination of the following constructs: full length FLRT3 tagged at the C-

terminus with FLAG; FLRT3 lacking the intracellular domain and fused with GFP; full length ROBO1 tagged at C-terminus with Myc; ROBO1 lacking the intracellular domain. After 24 hours the cells were lysed in lysis buffer (150mM NaCl, 20mM Tris [pH7.4], 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1mM Na₃VO₄, 1mM EDTA, 5mM NaPP, 5mM NaF and a protease inhibitor cocktail [*Complete EDTA-free* from Roche]) and the cell lysates were then incubated for 2 hours at 4°C with the ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel resin (Sigma) or with the anti-FLRT3-ECD antibody (R&D systems) plus protein-G sepharose. The western blots were probed with the anti-Myc (generated in house from mouse ascites), anti-Flag (Abcam) and anti-FLRT3 (R&D) primary antibodies, and anti-mouse HRP and anti-goat HRP (Jackson ImmunoResearch) or anti-rabbit HRP (Amersham) secondary antibodies. For co-localization assays, HEK293T cells were transfected with the following constructs: full length FLRT3 tagged at C-terminus with FLAG or FLRT3 lacking the intracellular domain and fused with GFP and full length ROBO1 tagged at C-terminus with Myc. After 24 hours, the cells were fixed with 4% PFA, permeabilized with 0.1% Triton X-100 and blocked with 4% donkey serum. The primary antibodies used were anti-Myc (generated from mouse ascites in house) and anti-Flag (Abcam), and the secondary antibodies used were an anti-mouse cy2 and anti-rabbit cy3 (Jackson ImmunoResearch).

Quantification of surface receptors and co-localization

Immunostained cells were examined by confocal microscopy using a TCS SP2 laser scanning confocal spectral microscope attached to a DMIRE2 inverted microscope (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Germany) with argon and HeNe lasers. Images were taken using a 63× numerical aperture objective with a 4× digital zoom and standard (1 Airy disk) pinhole. The size of the optical image was 0.5 μm.

Co-localization was measured by using the “colocalization” plug-in of the ImageJ version 1.43 freeware by Wayne Rasband (National Institutes of Health). Briefly, for each growth cone the number of pixels positive for both FLRT3 and Robo1 was assessed, and this value was divided by the total number of positive pixels for FLRT3. For DCC co-localization with VAMP2 or Rab11, the intracellular pool of DCC (Int. DCC) was measured by subtracting the surface pixels positive for DCC from total DCC-positive pixels. The number of pixels positive for both VAMP2 or Rab11 and Internal DCC was quantified and divided by the number of total pixels positive for VAMP2 or Rab11 respectively.

DCC surface levels were analyzed using the integrated density measurement function of ImageJ version 1.43. A standard threshold (50 for 8-bit image) was assigned to eliminate background staining in the images containing DCC surface and phalloidin staining. Then, the area for each growth cone was delineated and the integrated density for DCC defined as $\Sigma(\text{each pixel intensity value above threshold})$ was measured. This value was normalized to the area of the growth cone (number of total phalloidin-positive pixels).

Quantification of the rostro-caudal axonal dispersion

The ImageJ software with the Oval profile plug-in was used to quantify the rostro-caudal dispersion of TCAs over 180°. The mean fluorescence intensity was calculated for every three degrees and normalized. This method of quantification allows rostro-caudal dispersion defects to be monitored in co-cultures, as described previously [S1, S2]. The statistical analysis was performed using a two-way ANOVA with the SPSS software. To quantify the *in vivo* rostro-caudal dispersion of TCAs, the width of the axonal bundle labeled by focal rostral injections was measured at the entrance of the

subpallium (w) and within the subpallium (W) at the exit of the corridor (ImageJ software). To quantify the dispersion of axons, we subtracted the values of w to W for each brain, and divided by the highest value obtained in order to normalize the data. The Student's t test was used for comparisons between conditions.

Supplemental References

- S1. Bielle, F., Marcos-Mondéjar, P., Leyva-Díaz, E., Lokmane, L., Mire, E., Mailhes, C., Keita, M., García, N., Tessier-Lavigne, M., Garel, S., et al. (2011). Emergent growth cone responses to combinations of slit1 and netrin 1 in thalamocortical axon topography. *Current biology : CB* 21, 1748-1755.
- S2. Powell, A.W., Sassa, T., Wu, Y., Tessier-Lavigne, M., and Polleux, F. (2008). Topography of thalamic projections requires attractive and repulsive functions of Netrin-1 in the ventral telencephalon. *PLoS Biol* 6, e116.