



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Paper de la molècula d'adhesió neuronal Ncam2 en desenvolupament i plasticitat neuronal

Antoni Parcerisas Mosqueda

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

---

INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA DE BARCELONA  
PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA

# **Paper de la molècula d'adhesió neuronal Ncam2 en desenvolupament i plasticitat neuronal**

Antoni Parcerisas Mosqueda

Barcelona, Juny 2017

Programa de doctorat de Biomedicina



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

---

INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA DE BARCELONA  
PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA

## **Paper de la molècula d'adhesió neuronal Ncam2 en desenvolupament i plasticitat neuronal**

Memòria presentada per Antoni Parcerisas Mosqueda, llicenciat en Bioquímica, per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Els Estudis de tercer cicle s'han emmarcat en el programa de Doctorat en Biomedicina de la Universitat de Barcelona. El projecte de Tesi Doctoral està inscrit al Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. El treball experimental i la redacció de la memòria que es presenten han estat dirigits pels Drs. Eduardo Soriano García i Lluís Pujadas Puigdomènech, i tutoritzats pel Dr. Eduardo Soriano García.

Barcelona, Juny 2017

Vist i plau dels directors de la tesi i del tutor:

Dr. Lluís Pujadas Puigdomènech

Dr. Eduardo Soriano García

El Candidat a Doctor,

Antoni Parcerisas Mosqueda





"Caus a terra molt avall,  
creus que no te'n sortiràs.  
Però amb els mesos te n'adones  
que tornes a començar.  
I a força de molt de caure  
i de tornar-te a aixecar.  
veus que les coses no canvien però ja no ets qui eres abans."

*"Lax'N'Busto"*

"L'èxit no és la clau de la felicitat. La felicitat és la clau de l'èxit. Si estimes  
el que fas tindràs èxit."

*Albert Schweitzer*



A les meves dues floretes,  
a la família,  
als amics,  
a tu, per estar sempre al meu costat,  
i al meu pare.





# **Agraiments**



Sóc on sóc i he aconseguit el somni que de petit buscava gràcies a molta gent. Tota la gent que m'ha acompanyat en aquest viatge es mereix un agraïment. És difícil posar amb paraules sentiments, imatges i records...però he tingut molta sort amb la gent que m'ha envoltat en aquest camí. La vida m'ha fet passar per l'off-road, però això m'ha fet madurar i apreciar moltes coses, una d'elles la gent que m'envolta...perquè per molt complicat que es posi el camí, sempre he tingut gent collonuda al meu voltant...moltes gràcies!!!

Agrair especialment al Dr. Eduardo Soriano per obrir les portes del seu laboratori, oferir-me la possibilitat de realitzar la tesi i tot el suport rebut per tirar endavant els projectes. Agrair al Dr. Lluís Pujadas per ensenyar-me durant aquests anys i per l'esperit crític.

El Dr. Fernando Albericio, l'aventura científica va començar amb un "Passa l'estiu al parc"...moltes gràcies!!

També agrair a la gent amb la qual hem col·laborat per poder realitzar els diferents experiments, especialment la gent del laboratori d'en Dr.Jens Lüders, en Ricardo i l'Artur, i a la Joana i en Peter del laboratori d'en Dr.Ramon Trullas.

Del lab, donar les gràcies a tots els que estan i han passat. Els postdocs, en Fausto, la Marta, la Yas, en Jesús, la Mònica i sobretot a l'Ash...sempre tenint cura que no ens falti res, حارس ملاك. Els que ja han marxat, Mar, Carles, Núria, Esther, Jan, Bea, Sara, Ori, Roman, el lab ha canviat molt des de que no hi sou. Hi ha moltes coses que em fan pensar amb vosaltres i les històries viscudes...però encara ens queden molts viatges i aventures per viure fora del lab. A la Sara i la seva passió per la ciència. A en Roman i les seves mitocondries vermelles. Entrar a la sala, és veure en Carles i la Mar de costat, entrar per 5min i estar una hora parlant i divagant amb en Carles. A la Núria, quants cafès, hores d'injeccions, converses i birres...m'has ajudat molt...sempre tant positiva, el final m'he n'he ensortit amb la tesi...ara a volar. A la camorra italiana (Sere i Dani) per estar sempre al lab i animar el silenci amb les seves converses. A tu Sere, per tot l'ajut al llarg de la tesi i a la recta final, m'has comprès i m'has animat en cada figura, moltes gràcies. També agrair a la gent del laboratori dels Toni's, la Vane, l'Andreu, la Miriam i sobretot l'Oscar. Totes les batalletes d'Indonèsia, amb tu, l'Ori i la Sara...quin fart de riure, tot i algun espant ens ho vam passar molt bé, cada dia acabava passant la mosquitera xD.

A Zipi-zape...sou espectaculars, moltes gràcies per tot el temps junts, les converses a cultius i la paciència en la recta final..."ja m'agradarà veure-us a vosaltres" XD, quan hi estigueu em tindreu al vostre costat igual que jo us he tingut a vosaltres...moltíssimes gràcies...i no us deixeu els controls jajaja. A tu Cris, també per totes les converses pujant a peu des de fa més de 5anys, perquè ets una gran científica (només t'ho has de creure!!). A tu Marc, perquè ets un cas d'estudi.

A tots els estudiants de màster i grau que han passat pel laboratori. Especialment la Libertad i la Berta Fabrega. També a les estudiants que m'han ajudat, especialment a la Marina Ramiro i l'Alba Ortega.

Un especial agraïment a la gent de la facility de microscòpia de l'IRB, especialment a l'Anna i la Lidia. Amb totes les hores que he passat entre microscopis ja és la meva segona casa. Perquè us mereixeríeu un pastís cada dia!! Sempre ajudant i procurant que els experiments surtin, he après moltíssim de vosaltres, moltes gràcies!!

També un agraïment especial a la Lia i l'Antonia de proteòmica perquè l'experiment ha sortit molt bé.

A tu, Franki, per ser l'amic que està al costat en tots els moments, no ets família però per mi ets com un germà. Hi ha tantes històries viscudes junts, des de festes majors a Tona, cap d'anys a Barcelona, viatges pel món, o una birra en un bar...i espero que siguem recorrent el món junts.

També agrair a la gent de Tona i Balenyà, la llista de noms seria molt llarga, amb els que vaig créixer i "jugar a futbol". En Castro, per totes les batalletes viscudes...les imatges al cap valen més que mil paraules. Nyazo...va ja veuràs que la tesi és un moment!!!

A en Valldeneu, per tot el viscut, des de can guarro, bodokais, festes a Razz, muslitos, els mesos d'exàmens...hem viscut molt bons moments i els que vindran!!

A tots els amics del "Portalet", pels bons moments, els riures i les converses. Especialment amb els que hem conviscut més temps a Barcelona, Quim, Martí i Gali. A tu Gali, per fer-me costat i les frases d'ànim al llarg del temps, perquè som un exemple de que les bales perdudes es poden reorientar i trencar esquemes, no hi ha límits que empresonin les ganes. A en Pol per les converses als peus del Bastiments. A en Pompei, per la tapa tan ben parida i tots els moments compartits.

A la gent de la carrera de Química, Mariona, Cone, Molas, Jan, Vega, Bal, Guiu, Alba i Sonia, per totes les quimifarres, festes a Razz, fortran xD. A en Cone per la convivència a l'hospi...un gran favor que no s'oblida!!

A la gent de Bioquímica, Mire, Laura, Sonia, Víctor, Facu, i especialment a l'Edu, la Laia i la Núria Cortés. A l'Edu per totes les hores viscudes junts...a dins a la biblioteca, als labs o als bars...ens hem de veure més sovint!!

A tu Núria (eritròcit!!!) pels labs, tots els labs junts :) les converses a Pals i les combinacions impossibles per veure'ns. Moltes gràcies en aquest tram final...les dosis d'ànims i l'ajuda!!!

A la Irene, perquè gràcies al teu suport vaig poder començar el doctorat, això no ho oblidaré mai i t'estaré agraït sempre.

A la Berta Torres, per tots els anys i històries compartides. I la Sonia Abad per tots els cafès durant el master i el docotrat!!

### **Davis**

BAAAABAAAMMMMMM

Thanks to all the people that I met in Davis!!

In special, Juliano and Ilaria, thanks so much for all the great moments. "This is for us". You were my family in Davis, the stage was amazing because of you. We shared a lot of funny moments that I will never forget!! When will you come to Barcelona to dance Sarrada?!!

Una mención especial a Inés. Muchísimas gracias por los momentos y cafés compartidos en Davis y en el Sofias xD, y por todos los chaparrones que hemos pasado, la chica del tiempo. A Ana y Sendoa, por enseñarme Davis. A los tres por Yosemite, fue muy espectacular.

Finalment al Sergi, l'Anna i (el torbellino alegre d'en) Marc. En Sergi per ajudar-me tantíssim en tot. He après molt i estic molt content de l'oportunitat que m'has donat. A l'Anna per totes les converses i consells científics i no científics. Espero que us vagi molt bé l'aventura americana!! Thanks also to Simo and Anna La Torre Lab peolpe, Keiko, Jisoo, Adam, Corinne and César.

A l'Alba!! ets un sol del sud. Aquesta tesi i jo no seríem el mateix sense tu. Els dos sumem i continuarem sumant, perquè m'encanta el teu esperit rebel, crític i lluitador...que no s'apagui...que arribaràs molt lluny perquè ets una gran científica, persona i companya de viatge de la vida!!!

A la família...petita però imprescindible. Les tietes, els cosins i sobretot a les meves dues floretes!!!

Sister, tu em vas treure del pou...12 anys després, dos carreres i un futur doctorat a sota el braç, i tot gràcies aquella conversa. Necessitava que algú em tragués del núvol negre que estava i allà estaves tu...moltes gràcies. Tot i que hem sigut un desastre en moltes coses sempre hem tirat endavant amb un esclap i una espardenyia...sinó és a la segona serà a la tercera però ens en sortirem...

A tu mare, per tot!! ets la persona més lluitadora que he conegut mai, mai t'has rendit. Has lluitat perquè tinguéssim uns estudis i un futur...mira on estem ara gràcies a tu!! Ara has de disfrutar i mirar com han crescut els teus fruits i lo lluny que arribarem!!

Finalment tu!!! Que dir-te si estàs tant lluny de mi...però sóc com sóc per tu... per aquells estius descobrint el món a dalt del camió. Per mi era com si estiguéssim a una missió de d'exploració a la selva o d'astronautes a la lluna per primera vegada. Era el nen més afortunat del món, acabava el cole i podia recórrer tot un univers al teu costat cada estiu. Anar per les granges amb els veterinaris i descobrir els animals, pujar a totes les cosetjadores i voltar pels camps, dinar en taules enormes de pagès...per a mi cada dia era una aventura nova. També quan et veia doblgant el ferro roent, erets un mag!! i passant cables...era molt feliç al teu costat!! Et trobo molt a faltar però sóc on sóc i com sóc perquè em va tocar madurar, a base d'hòsties, però sé que estaries content de mi, aquell marrec ha crescut i està a punt de ser un doctor!!

Tu em vas obrir els ulls, només amb 6 anys jo deia que volia investigar per curar la gent!! Quan els altres nens volien ser bombers o futbolistes...jo ho tenia clar i he aconseguit fer realitat aquell somni impulsat per tu quan descobríem l'univers junts...



## "You're Not There"

I only got you in my stories  
And you know I tell them right  
I remember you and I, when I'm awake at night  
So give it up for fallen glory  
I never got to say goodbye  
I wish I could ask for just a bit more time

Every step I take, you used to lead the way  
Now I'm terrified to face it on my own

You're not there  
To celebrate the man that you made  
You're not there  
To share in my success and mistakes  
Is it fair?  
You'll never know the person I'll be  
You're not there  
With me

Though I know that you're not there  
I still write you all these songs  
It's like you got the right to know what's going on  
As I struggle to remember how you used to look and sound  
At times I still think I can spot you in the crowd

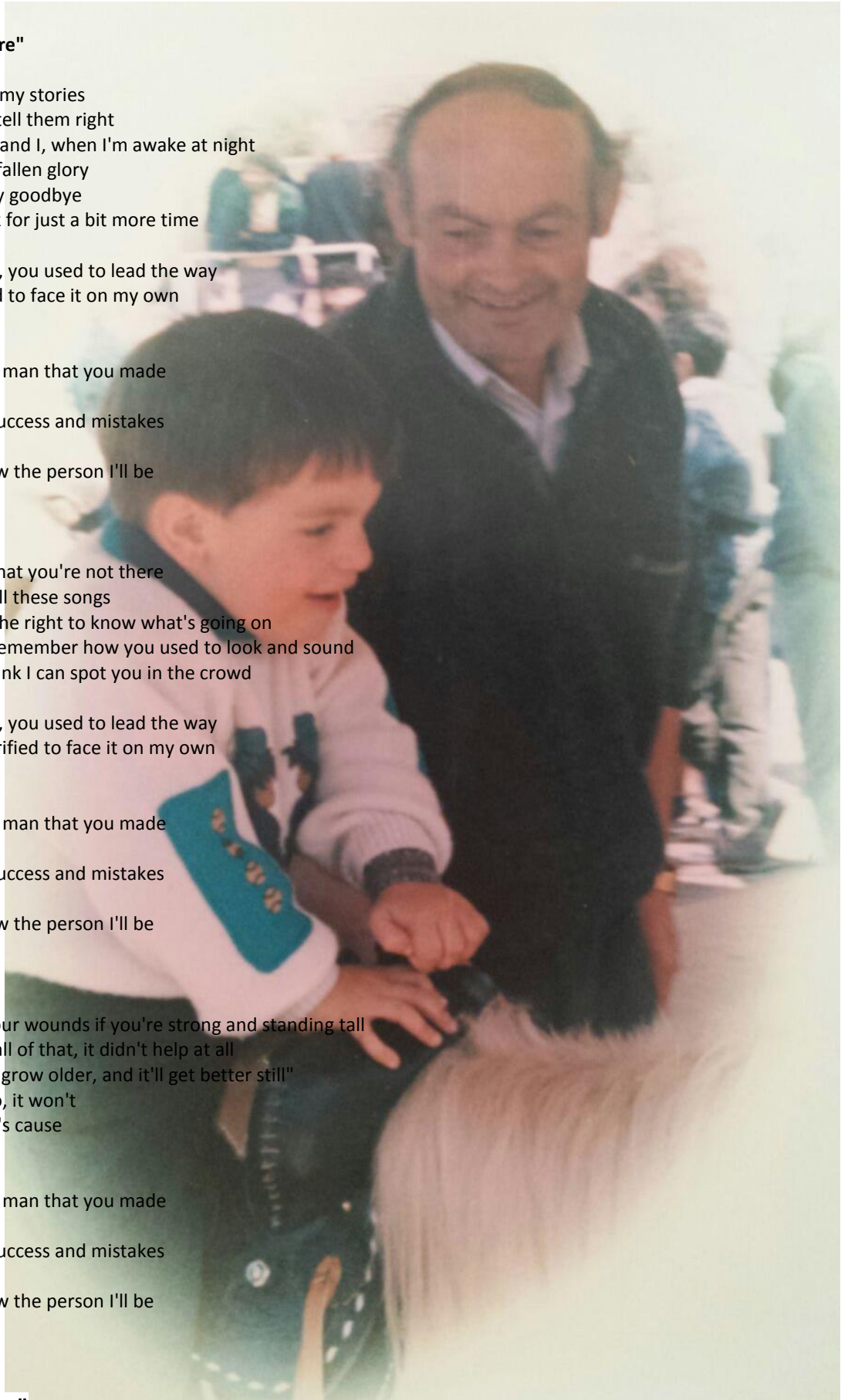
Every step I take, you used to lead the way  
And now I'm terrified to face it on my own

You're not there  
To celebrate the man that you made  
You're not there  
To share in my success and mistakes  
Is it fair?  
You'll never know the person I'll be  
You're not there  
With me

Time can heal your wounds if you're strong and standing tall  
I've been doing all of that, it didn't help at all  
They say, "You'll grow older, and it'll get better still"  
Yes, I will, but no, it won't  
They don't get it's cause

You're not there  
To celebrate the man that you made  
You're not there  
To share in my success and mistakes  
Is it fair?  
You'll never know the person I'll be  
You're not there  
With me

## "Lukas Graham"







# Índex

<b>Introducció</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Desenvolupament del sistema nerviós</b> .....	<b>3</b>
1.1 Formació i regionalització del tub neural .....	4
1.2 Formació del còrtex .....	6
1.2.1 <i>Neurons piramidals i migració radial</i> .....	6
1.2.2 <i>Interneurones i migració tangencial</i> .....	8
1.3 Mecanismes moleculars generals en la migració .....	9
1.3.1 <i>Leading process</i> .....	9
1.3.2 <i>Nucleoquinesi</i> .....	9
1.3.3 <i>Tailing process</i> .....	10
1.3.4 <i>Translocació somal</i> .....	10
1.4 Formació de l'hipocamp .....	11
1.4.1 <i>Anatomia</i> .....	11
1.4.2 <i>Desenvolupament</i> .....	12
1.4.3 <i>Connectivitat</i> .....	14
<b>2. Polarització neuronal</b> .....	<b>15</b>
2.1 Polarització neuronal.....	16
2.1.1 <i>In vitro</i> .....	16
2.1.2 <i>In vivo</i> .....	18
2.2 Mecanismes intracel·lulars en la polarització neuronal.....	19
2.2.1 <i>Citoesquelet</i> .....	19
2.2.2 <i>Vies de senyalització</i> .....	22
2.2.3 <i>Tràfic vesicular i molècules de transport</i> .....	26
2.2.4 <i>Degradació proteica local</i> .....	26
2.2.5 <i>Centrosoma</i> .....	27
2.2.6 <i>Barrera bioquímica</i> .....	27
2.3 Funcionament del con de creixement.....	28
2.4 Bucles positiu i negatiu .....	29
2.5 Mecanismes <i>in vivo</i> de la polarització neuronal .....	30
2.5.1 <i>Senyals extracel·lulars</i> .....	30
2.5.2 <i>Regulació transcricional</i> .....	31
2.6 Manteniment de la polaritat neuronal.....	32
2.6.1 <i>Fragment inicial de l'axó (AIS)</i> .....	32
2.6.2 <i>Organització i composició</i> .....	32
2.6.3 <i>Tràfic vesicular</i> .....	34
<b>3. Formació de l'arbre dendrític i axonal</b> .....	<b>35</b>
3.1 Desenvolupament de l'arbre dendrític.....	36

3.1.1	<i>Citoesquelet en la formació de l'arbre dendrític</i> .....	36
3.1.2	<i>Senyals extracel·lulars en la formació de l'arbre dendrític</i> .....	38
3.1.3	<i>Mecanismes dependents d'activitat en la formació de les dendrites</i> .....	38
3.1.4	<i>Tràfic vesicular i remodelació de les membranes</i> .....	39
3.2	Factors de transcripció i proteïnes d'unió a l'ADN involucrats en el desenvolupament dendrític i axonal.....	40
3.3	Ramificació de l'axó .....	41
3.3.1	<i>Citoesquelet en la ramificació axonal</i> .....	42
3.3.2	<i>Senyals extracel·lulars en la formació de l'axó</i> .....	43
3.3.3	<i>Mecanismes dependents d'activitat</i> .....	43
<b>4.</b>	<b>Sinaptogènesi</b> .....	<b>45</b>
4.1	Estabilització de dendrites i formació de sinapsis .....	46
4.2	Remodelació de la sinapsis .....	48
4.3	El citoesquelet en la formació de les espines dendrítiques .....	49
4.4	Estructura de l'espina dendrítiques.....	51
4.5	Refinament del terminal axonal .....	52
<b>5.</b>	<b>Plasticitat adulta</b> .....	<b>53</b>
5.1	Plasticitat sinàptica adulta .....	54
5.1.1	<i>Estructura de l'espina en plasticitat</i> .....	54
5.1.2	<i>Potenciació a llarg termini (LTP)</i> .....	56
5.1.3	<i>Depressió a llarg temps (LTD)</i> .....	58
5.1.4	<i>Plasticitat presinàptica</i> .....	58
5.2	Neurogènesi adulta .....	60
5.2.1	<i>Neurogènesi adulta en la SGZ</i> .....	60
5.2.2	<i>Neurogènesi adulta en la V-SVZ</i> .....	64
<b>6.</b>	<b>Molècules d'adhesió. Implicacions i funcions en neurobiologia</b> .....	<b>67</b>
6.1	Cadherines .....	68
6.1.1	<i>Cadherines clàssiques</i> .....	69
6.1.2	<i>Cadherines no clàssiques</i> .....	71
6.2.	Integrines .....	72
6.3	Neurexins/Neuroligins .....	73
6. 4	Proteïnes d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines .....	74
6.4.1	<i>Subfamília L1CAM</i> .....	74
6.4.2	<i>Contactines</i> .....	75
6.4.3	<i>DSCAMs</i> .....	76
6.4.4	<i>Molècules d'adhesió cel·lular neuronal (NCAMs): Ncam1</i> .....	76
<b>7.</b>	<b>Molècula d'adhesió cel·lular neuronal 2 (Ncam2)</b> .....	<b>79</b>

7.1 Gen NCAM2 .....	80
7.2 Proteïna .....	80
7.2.1 Dominis.....	80
7.2.2 Modificacions postraduccional.....	81
7.2.3 Interaccions .....	81
7.3 Expressió.....	82
7.4 Funcions.....	82
7.4.1 Bulb olfactori .....	82
7.4.2 Còrtex i hipocamp.....	83
7.4.3 Medul·la espinal .....	83
7.5 Ncam2 en patologies neuronals .....	84
<b>Objectius.....</b>	<b>89</b>
<b>Materials i mètodes.....</b>	<b>91</b>
<b>Resultats .....</b>	<b>105</b>
<b>Capítol 1. L'expressió de Ncam2 en el sistema nerviós central.....</b>	<b>107</b>
1.1 Ncam2 s'expressa en el telencèfal des del desenvolupament.....	108
1.2 Detecció de l'ARNm de Ncam2.1 en desenvolupament .....	109
1.3 Patró d'expressió de la proteïna Ncam2 en cervell.....	111
1.4 Patró proteic de Ncam2 durant el desenvolupament en còrtex i hipocamp.....	115
<b>Capítol 2. El paper de Ncam2 en la polarització neuronal i la formació</b>	
<b>de l'arbre dendrític i axonal <i>in vitro</i> .....</b>	<b>119</b>
2.1 Ncam2 s'expressa en neurones embrionàries d'hipocamp <i>in vitro</i> i la seva sobreexpressió afecta a la longitud de les dendrites .....	120
2.2 El dèficit de Ncam2 provoca un desenvolupament neuronal aberrant .....	123
2.3 Ncam2.1 és essencial per la formació de l'arbre dendrític .....	125
2.4 El dèficit de Ncam2 altera els marcadors d'estabilitat del citoesquelet .....	128
2.5 El silenciament de Ncam2 produeix una retracció de les dendrites existents i un con de creixement desestructurat .....	130
2.6 La pèrdua progressiva de Ncam2 produeix un canvi en el citoesquelet.....	133
2.7 El Taxol reverteix l'aparició de l'arbre dendrític aberrant.....	135
2.8 La pèrdua de Ncam2 afecta la polimerització de microtúbuls.....	137
<b>Capítol 3 Funció de Ncam2 en el desenvolupament del còrtex <i>in vivo</i>.....</b>	<b>139</b>
3.1 Ncam2 participa en la formació del còrtex .....	140
3.2 La pèrdua de Ncam2 modifica la morfologia de les neurones posicionades ectòpicament <i>in vivo</i> .....	142
3.3 Els canvis d'expressió de Ncam2 i els marcadors neuronals.....	143
<b>Capítol 4 Paper de Ncam2 en la plasticitat</b>	
<b>adulta en l'hipocamp .....</b>	<b>147</b>

4.1 Ncam2 regula els contactes sinàptics en hipocamp.....	148
4.2 Ncam2 modula la neurogènesi adulta.....	150
<b>Capítol 5. L'interactoma de Ncam2 .....</b>	<b>153</b>
5.1 Estudi de l'interactoma de Ncam2 en cervell anterior de ratolí.....	154
5.2 Anàlisi bioinformàtic de l'interactoma de Ncam2.....	160
5.2.1 Anàlisi d'enriquiment per GOs i KEGGs .....	161
5.3 Validacions.....	166
<b>Discussió .....</b>	<b>171</b>
<b>1. Corticogènesi i posicionament neuronal.....</b>	<b>172</b>
1.1 Expressió de Ncam2 durant el desenvolupament neuronal .....	172
1.2 Funció de Ncam2 en migració neuronal i diferenciació neuronal .....	172
1.3 Mecanisme involucrats en la funció de Ncam2.....	174
1.4 Esquema representatiu de la funció de Ncam2 en migració neuronal.....	176
1.5 Possibles implicacions patològiques de la funció de Ncam2 en migració neuronal .....	177
<b>2. Polarització i formació de l'estructura neuronal <i>in vitro</i>.....</b>	<b>178</b>
2.1 Ncam2 en la polarització i formació de l'arbre dendrític .....	178
2.2 Ncam2 i l'estabilitat del citoesquelet en dendrites.....	178
2.3 Mecanismes involucrats en la dendritogènesi .....	179
2.4 Ncam2 en el desenvolupament del terminal axonal.....	180
2.5 Ncam2 en el con de creixement .....	181
2.6 Ncam2 en la dinàmiques de microtúbuls .....	181
2.7 Esquema representatiu de la funció de Ncam2 en la polarització neuronal .....	182
2.8 Possibles implicacions patològiques de la funció de Ncam2 en polarització.....	183
<b>3. Plasticitat neuronal adulta .....</b>	<b>184</b>
3.1 Manteniment sinàptic .....	184
3.1.1 Estructura postsinàptica.....	184
3.1.2 Estructura presinàptica .....	186
3.1.3 Possibles implicacions patològiques de la funció de Ncam2 en el manteniment de les sinapsis.....	187
3.2. Neurogènesi adulta .....	188
3.3 Esquema representatiu de la funció de Ncam2 en plasticitat neuronal .....	190
<b>4. Paper de Ncam2 <i>in vivo</i> .....</b>	<b>191</b>
4.1 Morfogènesi neuronal in vivo .....	191
4.2 Sinaptogènesi i manteniment de les sinapsis.....	192
<b>5. Mecanismes moleculars.....</b>	<b>194</b>
5.1 Localització cel·lular.....	194

5.2 Desenvolupament i manteniment de l'estructura neuronal .....	195
5.3 Esquema global de les funcions de Ncam2 al cervell .....	197
<b>Conclusions .....</b>	<b>199</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>203</b>
<b>Apèndix.....</b>	<b>221</b>

# **Llistes de taules i figures**



## Introducció

<b>Figura I.1.1.</b> Neurulació de la placa neural.....	4
<b>Figura I.1.2.</b> Esquema representatiu de la migració neuronal.....	6
<b>Figura I.1.3.</b> Esquema del model dins-fora de formació del còrtex en ratolí .....	7
<b>Figura I.1.4.</b> Esquema representatiu de la migració radial depenen de la glia radial.....	8
<b>Figura I.1.5.</b> Molècules involucrades en la migració tangencial i radial .....	9
<b>Figura I.1.6.</b> Esquema del procés de locomoció .....	10
<b>Figura I.1.7.</b> Esquema de l'estructura i la laminació de l'hipocamp .....	11
<b>Figura I.1.9.</b> Esquema de la formació del <i>cornus ammonis</i> i el gir dentat.....	13
<b>Figura I.1.9.</b> Esquema del circuit trisinàptic de la formació hipocàmica .....	14
<b>Figura I.2.1.</b> Esquema representatiu del procés de polarització neuronal <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .....	17
<b>Figura I.2.2.</b> Esquema representatiu de la dinàmica del citoesquelet d'actina .....	20
<b>Figura I.2.3.</b> Esquema representatiu de la dinàmica del citoesquelet de microtúbuls .....	21
<b>Figura I.2.4.</b> Esquema representatiu de les vies de senyalització i mecanismes involucrats en la polarització neuronal .....	22
<b>Figura I.2.5.</b> Esquema representatiu de la dinàmica del con de creixement en front un estímul extern .....	29
<b>Figura I.2.6.</b> Mecanismes involucrats en el manteniment de la polaritat neuronal.....	33
<b>Figura I.3.1.</b> Esquema representatiu dels mecanismes depenen d'activitat de calci en el desenvolupament de la dendrita .....	38
<b>Figura I.3.2.</b> Esquema representatiu de l'organització dels microtúbuls i diferents orgànuls al llarg de la neurona .....	39
<b>Figura I.3.3.</b> Esquema representatiu dels canvis a nivell de citoesquelet durant el procés d'elongació i ramificació de l'axó. ....	41
<b>Figura I.4.1.</b> Esquema representatiu del procés de sinaptogènesi.....	47
<b>Figura I.4.2.</b> Esquema representatiu de l'evolució de l'estabilitat de les dendrites i de les espines al llarg de la maduració neuronal .....	49
<b>Figura I.4.3.</b> Esquema representatiu de la dinàmica d'actina en la formació de les espines dendrítiques .....	50
<b>Figura I.4.4.</b> Esquema representatiu de la dinàmica de microtúbuls en la formació del botó sinàptic .....	52
<b>Figura I.5.1.</b> Esquema representatiu dels diferents mecanismes involucrats en la LTP.....	57
<b>Figura I.5.2.</b> Esquema representatiu dels diferents mecanismes involucrats en la plasticitat presinàptica.....	59
<b>Figura I.5.3.</b> Esquema representatiu dels diferents estadis de la neurogènesi adulta en la SGZ...	61
<b>Figura I.5.4.</b> Esquema representatiu de la integració de la nova neurona al circuit existent .....	63
<b>Figura I.5.5.</b> Esquema representatiu de la neurogènesi en la V-SVZ i la incorporació de les noves neurones al bulb olfatori.....	65

<b>Esquema I.6.1.</b> Esquema dels diferents membres de la família de les cadherines. ....	69
<b>Esquema I.6.2.</b> Esquema dels diferents processos en els quals intervenen les cadherines clàssiques. ....	70
<b>Figura I.6.3.</b> Esquema representatiu de les vies de senyalització activades per Ncam1. ....	77
<b>Figura I.6.4.</b> Esquema representatiu de les vies de senyalització i mecanismes on Ncam1 es troba involucrada en la sinapsis madura. ....	78
<b>Figura I.5.1.</b> Estructura de les isoformes de Ncam2. ....	80
<b>Figura I.5.2.</b> Representació esquemàtica de les projeccions axonals de l'epiteli olfactiv i vomeronasal. ....	82

## Resultats

<b>Figura R.1.1.</b> Expressió de Ncam2 en el cervell del ratolí. ....	108
<b>Figura R.1.2.</b> Expressió de Ncam2.1 en el desenvolupament. ....	110
<b>Figura R.1.3.</b> Patró d'expressió proteic de Ncam2, embrionari 14. ....	111
<b>Figura R.1.4.</b> Patró d'expressió proteic de Ncam2, postnatal 0. ....	112
<b>Figura R.1.5.</b> Patró d'expressió proteic de Ncam2, postnatal 5. ....	113
<b>Figura R.1.6.</b> Patró d'expressió proteic de Ncam2, postnatal 15. ....	114
<b>Figura R.1.7.</b> Patró d'expressió proteic de Ncam2 durant la formació del còrtex. ....	115
<b>Figura R.1.8.</b> Patró d'expressió proteic de Ncam2 durant la formació de l'hipocamp. ....	116
<b>Figura R.2.1.</b> L'expressió de Ncam2 en cultius hipocampals embrionaris. ....	120
<b>Figura R.2.2.</b> L'efecte de la sobreexpressió de Ncam2 en cultius <i>in vitro</i> . ....	122
<b>Figura R.2.3.</b> L'expressió de Ncam2 en neurones, tranfectades amb els ShRNAs. ....	123
<b>Figura R.2.4.</b> Efecte del dèficit de Ncam2 en cultius <i>in vitro</i> . ....	124
<b>Figura R.2.5.</b> Efecte del silenciament de Ncam2 sobre el creixement axonal en cultius <i>in vitro</i> . ....	125
<b>Figura R.2.6.</b> El rescat proteic de Ncam2.1 reverteix l'efecte sobre l'arbre dendrític del silenciament total de Ncam2. ....	127
<b>Figura R.2.7.</b> El dèficit de Ncam2 no modifica els nivells d'actina i tubulina, només la seva estabilitat. ....	128
<b>Figura R.2.8.</b> El dèficit de Ncam2 canvia els nivells de Map2 i tubulina acetilada. ....	129
<b>Figura R.2.9.</b> La pèrdua de Ncam2 produeix una retracció de les dendrites existents a l'inici de l'estadi 4 de Banker i també genera l'aparició de noves prolongacions des del soma. ....	131
<b>Figura R.2.10.</b> La morfologia i mobilitat dels cons de creixement es veu alterada amb la pèrdua de Ncam2. ....	132
<b>Figura R.2.11.</b> Immunodetecció de les neurones enregistrades al llarg del temps. ....	134
<b>Figura R.2.12.</b> El tractament amb Taxol reverteix l'aparició de les dendrites aberrants amb la pèrdua de Ncam2. ....	136
<b>Figura R.2.13.</b> La pèrdua de Ncam2 genera canvis en les dinàmiques de polimerització de microtúbuls. ....	137
<b>Figura R.2.14.</b> Cometes en neurones que presenten dos proto-axons. ....	138

<b>Figura R.3.1.</b> Canvis en l'expressió de Ncam2 produeixen canvis en la migració de les neurones corticals.....	141
<b>Figura R.3.2.</b> La pèrdua de Ncam2 produeix una morfologia atípica de les neurones posicionades ectòpicament <i>in vivo</i> .....	143
<b>Figura R.3.3.</b> El canvis d'expressió de Ncam2 poden afectar als marcadors neuronals.....	144
<b>Figura R.4.1.</b> Efecte del dèficit de Ncam2 en l'hipocamp adult. ....	149
<b>Figura R.4.2.</b> Efecte de la sobreexpressió de Ncam2 en la neurogènesi adulta d'hipocamp..	150
<b>Figura R.5.1.</b> Validació de l'abordatge experimental per immunoprecipitar Ncam2.....	154
<b>Taula R.5.1.</b> Proteïnes detectades amb més d'un pèptid en l'experiment d'espectrometria de masses. ....	156
<b>Taula R.5.2.</b> Proteïnes detectades en l'experiment d'espectrometria de masses.....	159
<b>Figura R.5.2.</b> Bitmap de l'interactoma de Ncam2.....	160
<b>Taula R.5.3.</b> Processos biològics enriquits en l'anàlisi d'ontologies del gen.....	161
<b>Taula R.5.4.</b> Funcions moleculars enriquides en l'anàlisi d'ontologies del gen.....	163
<b>Taula R.5.5.</b> Components cel·lulars enriquits en l'anàlisi d'ontologies del gen.....	164
<b>Taula R.5.6.</b> Vies enriquides segons l'anàlisi de l'Enciclopèdia de gens i genomes de Kyoto (KEGGs).....	165
<b>Figura R.5.3.</b> Validació de les interaccions de Ncam2 amb les proteïnes 14-3-3 i la Granulin.....	166
<b>Figura R.5.4.</b> Ncam2.1 col·localitza amb Map2 en dendrites.....	167
<b>Figura R.5.5.</b> Ncam2.1 col·localitza amb actina en cons de creixement i dendrites.....	168

## Discussió

<b>Figura D.1.</b> Esquema representatiu de les funcions que realitza Ncam2 en la migració neuronal.....	176
<b>Figura D.2.</b> Esquema representatiu de les funcions que realitza Ncam2 en la morfogènesi neuronal <i>in vitro</i> .....	183
<b>Figura D.3.</b> Assaig de proliferació en línees estables 293T de sobreexpressió de les isoformes Ncam2.1 i Ncam2.2.....	189
<b>Figura D.4.</b> Esquema representatiu de les funcions que realitza Ncam2 en la plasticitat neuronal en adult. ....	190
<b>Figura D.5.</b> Esquema global de les funcions de Ncam2.....	197

## Apèndix

<b>Taula A.1.</b> Llista total de les proteïnes detectades en l'experiment d'espectrometria de masses .	223
<b>Taula A.2.</b> Llista total de les proteïnes detectades en l'experiment d'espectrometria de masses	226
<b>Taula A.3.</b> Llista total dels processos biològics enriquits en l'anàlisi d'ontologies del gen. ....	227
<b>Taula A.4.</b> Llista total de les funcions moleculars enriquides en l'anàlisi d'ontologies del gen ....	229
<b>Taula A.5.</b> Llistat total dels components cel·lulars enriquits en l'anàlisi d'ontologies del gen.....	231
<b>Taula A.6.</b> Llista total de les vies enriquides segons l'anàlisi de l'Enciclopèdia de gens i genomes de Kyoto (KEGGs) .....	234

# **Llista d'abreviatures**

AIS: fragment inicial de l'axó  
ApoER2: receptor d'apoliproteïna E2  
aPKC: proteïna cinasa atípica C  
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolí fosfat  
BDNF: factor neurotròfic derivat de cervell  
BMP: proteïnes morfogèniques de l'os  
BP: bipolar  
CA: *cornu ammonis*  
CaM: calmodulina  
CaMK: cinasa dependent de calci-Calmodulina  
CP: placa cortical  
CR: Cajal-Retzius  
CREB: proteïna d'unió a la resposta de AMPc  
CREST : proteïna transactivadora a la resposta de Calci  
DG: gir dentat  
DIG-AP: fosfatasa alcalina conjugada amb l'anti-digoxigenina  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
DMSO: dimetilsulfòxid  
DNE: neuroepiteli dentat  
PSD: densitat postsinàptica  
FAK: cinasa d'adhesió focal  
FBS: Sèrum fetal boví  
FGF: factors de creixement dels fibroblast  
GAP: proteïnes activadores de GTPases  
GC: cèl·lules granulars  
GDI: proteïnes inhibidores de dissociació de nucleòtids de guanosina  
GEF: factors intercanviadors de nucleòtids de guanosina  
GFAP: proteïna àcida fibril·lar glial  
GoOP: l'aparell de Golgi de lloc d'avançada  
GTPases: guanosina-trifosfateses  
GSK3 $\beta$ : cinasa de la sintasa de glicogen 3 $\beta$   
HNE: neuroepiteli hipocampal  
IZ: zona intermèdia  
JNK1: cinasa N-terminal de JUN 1  
LP: procés líder  
LTD: depressió a llarg temps  
LTP: potenciació a llarg termini  
MZ: zona marginal  
MAP: proteïna associada a microtúbuls  
MARK: cinases reguladores de l'afinitat a microtúbuls  
MP: multipolar  
MTOC: centre organitzador de microtúbuls  
mTOR: cinasa diana de rapamicina en mamífers  
nBAF: factor específic neuronal associat a BRG-1  
NBT: nitroblau de tetrazole

NE: neuroepiteli  
NCAM: molècules d'adhesió cel·lular neuronal  
Ncam2: molècula d'adhesió cel·lular neuronal 2  
NeuroD1: factor de diferenciació neurogènic 1  
NHS: sèrum normal de cavall  
NGS: sèrum normal de cabra  
NGF : factor de creixement del nervi  
P/S: Penicil·lina 20U/mL i estreptomina 20U/mL  
PAR complex: complex deficient de particions  
PAK: cinasa activada-P21  
PBS: Tampó fosfat salí (PB10mM NaCl 140mM)  
PFA 4%: PFA (paraformaldehid) al 4% amb PB (tampó fosfat) 0.1M  
PGC: cèl·lules periglomerular  
PI3K: Cinasa  $PI_3$   
PIP<sub>3</sub>: fosfatidilinositol-3-fosfat (phosphatidylinositol-3-phosphate)  
PKA: proteïna cinasa depenent de AMP-cíclic  
PKC: proteïna cinasa C  
PMGS: sialidasa de la membrana plasmàtica dels gangliòsids  
PP: preplaca cortical  
PSD: densitat postsinàptica  
PSA-NCAM : molècula d'adhesió cel·lular neuronal polisialitzada  
PTEN: Fosfatasa i Tensina homòloga delecionada en el cromosoma 10  
RG: glia radial  
RIM1 $\alpha$ : proteïna reguladora de l'exocitosi en membranes sinàptica 1 $\alpha$   
SDS: dodecilsulfat sòdic  
SH: Src homology  
SOX2: factor de transcripció de la regió determinant del sexe caixa-Y  
SP: subplaca cortical  
SVZ: zona subventricular  
SGZ: zona subgranular  
Tiam1: proteïna de la cèl·lula T limfoma de invasió i metàstasi  
Trk: cinasa relacionada amb tropomiosina  
Tris-base: 2-Amino-2-hidroximetil-propà-1,3-diol  
TGF: factors de creixement transformant  
TP: procés de cua  
V- SVZ: zona ventricular-subventricular  
VGCC: canal de calci depenent de voltatge  
VZ : zona ventricular  
o/n: tota la nit  
VLDR : receptor de lipoproteïnes de densitat molt baixa

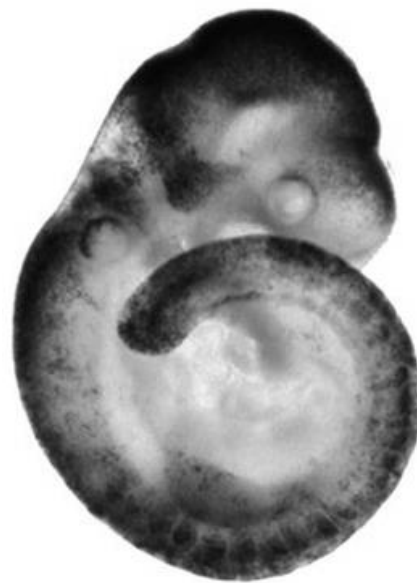


# Introducció





## 1. Desenvolupament del sistema nerviós



El cervell dels mamífers és una estructura molt complexa tant a nivell cel·lular com a nivell anatòmic. Està compost per una diversitat molt gran de tipus i subtipus cel·lulars que s'agrupen en estructures definides.

Aquestes estructures es connecten unes amb les altres de forma específica. És essencial un correcte posicionament i connexió de les neurones dins del context cel·lular i anatòmic.

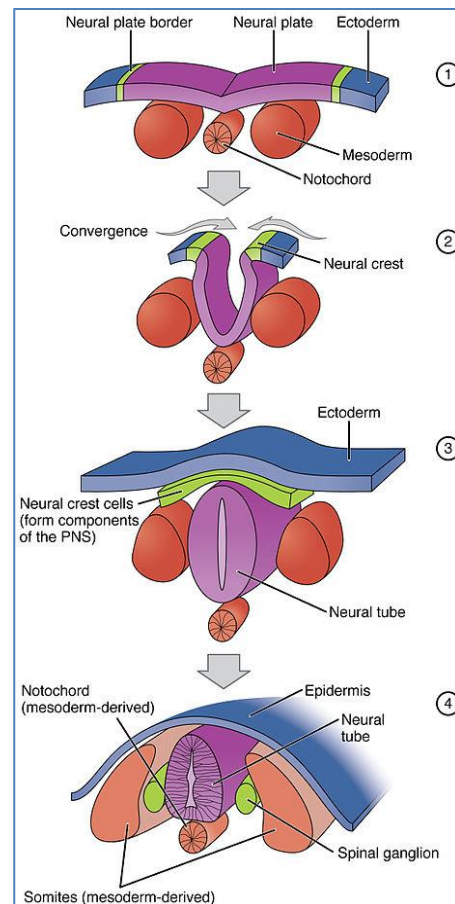
El cervell forma part del sistema nerviós central i està format per diferents tipus cel·lulars, principalment neurones i glia. A nivell anatòmic, el cervell està dividit en tres parts: prosencèfal, mesencèfal i romboencèfal. En aquestes regions del cervell, les neurones s'organitzen en nuclis o capes per donar lloc a estructures més complexes. Majoritàriament, totes les cèl·lules neuronals i glials que formen el cervell adult provenen d'un petit nombre de progenitors embrionaris. En les primeres etapes del desenvolupament, aquests progenitors s'expandiran, migraran i es diferenciaran per donar lloc a l'àmplia varietat de tipus cel·lulars que s'estructuren en diferents regions per poder controlar i processar la informació.

### 1.1 Formació i regionalització del tub neural

En estadis molt primerencs de l'embriogènesi té lloc el procés de gastrulació durant el qual es defineixen les tres capes embrionàries principals: l'ectoderma, el mesoderma i l'endoderma. Paral·lelament, del mesoderma es forma el notocordi, estructura cilíndrica que es troba adjacent a l'ectoderma i és essencial pel desenvolupament del sistema nerviós. En aquest estadi de la gastrulació també queda definida la topografia i els eixos principals de l'embrió: antero-posterior i dorso-ventral.

A continuació en l'embriogènesi, té lloc el procés de neurulació en el qual es forma la placa neural i evoluciona formant el tub neural (**figura 1.1**). Els diferents estadis de la neurulació es podrien resumir en els següents estadis (Gilbert, 2006):

1. **Formació i organització de la placa neural:** El notocordi secreta molècules senyalitzadores que diferencien els progenitors més pròxims de l'ectoderma a precursors neuronals que formaran la placa neural. Trobem diferents molècules de senyalització involucrades en aquest procés com per exemple la molècula *Sonic hedgehog* o l'acid retinòic.
2. **Curvatura de la placa neural:** el notocordi indueix l'inici de la curvatura de la placa neural. Els precursors que es troben entre la placa neural i la resta de l'ectoderma pateixen canvis a nivell de citoesquelet que permeten l'acostament dels dos plecs.
3. **Tancament del tub neural:** el tancament es produeix per la unió específica dels dos plecs. Durant aquest procés, els precursors que delimiten els plecs es desprenen del tub neural i generen la cresta neural. En aquest procés de tancament i unió són claus diferents proteïnes d'adhesió, com per exemple la N-cadherina.



**Figura 1.1.1. Neurulació de la placa neural.** L'ectoderma es diferencia i dona lloc a l'epidermis, la cresta neural i el tub neural. (Gilbert, 2006).

Com a conseqüència de la neurulació de l'ectoderma es generen l'epidermis, la cresta neural i el tub neural. Les cèl·lules que formen el sistema nerviós perifèric provenen, principalment, de

la cresta neural. Les cèl·lules neuronals que formaran el SNC, en canvi, provenen del tub neural. A més a més, la cavitat del tub neural donarà lloc als ventricles del SN. S'ha observat que problemes en la neurulació donen lloc a malalties greus com, per exemple, l'espina bífida (Greene and Copp, 2014).

L'embrió es va desenvolupant, i es produeixen processos de regionalització i diferenciació del tub neural que donen lloc al cervell i la medul·la espinal a la zona anterior i posterior, respectivament. En concret, aquests processos produeixen canvis tant a nivell anatòmic com cel·lular al llarg del tub neural que generen les diferents regions del cervell i la medul·la. En aquest sentit, el procés de formació i de regionalització del tub neural són fruit del control temporal i espacial d'un conjunt de molècules de senyalització, com per exemple l'àcid retinòic, la molècula *Sonic hedgehog*, la molècula Wnt, factors de creixement dels fibroblast (fibroblast growth factor, FGF) o factors de creixement transformant (transforming growth factor, TGF). Dins de la família dels TGF trobem les proteïnes morfogèniques de l'os (bone morphogenetic proteins, BMPs). Aquestes molècules es sintetitzen a les somites, estructures adjacents al tub neural, al notocordi i als extrems del tub neural, extrem dorsal (placa del sostre) i l'extrem ventral (placa del terra) (**figura I.1.1**). Trobem diferents tipus de molècules senyalitzadores: molècules que provoquen un efecte a les cèl·lules adjacents i molècules secretades que generen uns gradients de concentració al llarg de l'eix dorso-ventral i/o antero-posterior.

La combinació dels diferents gradients d'aquestes molècules al llarg dels eixos antero-posterior i dorso-ventral genera un entorn particular i únic a cada regió del tub neural. A més a més, aquestes molècules tenen receptors que activen cascades de senyalització que regulen la transcripció de diferents gens homeòtics, gens *Hox*. En aquest sentit, aquests gens tenen dominis d'unió a l'ADN que produeixen una modulació de la transcripció d'altres gens. D'aquesta manera, l'entorn únic genera l'especificació dels progenitors neuronals uniformes, que es transformen en progenitors neuronals específics amb un transcriptoma característic de cada regió.

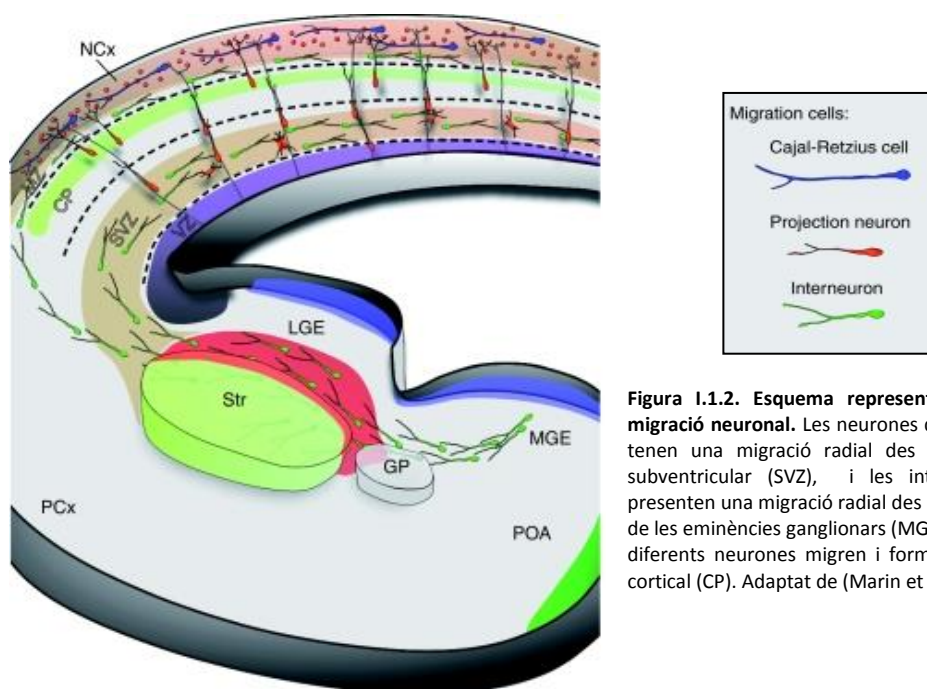
Així doncs, les diferents estructures anatòmiques del cervell són el resultat conjunt de processos de proliferació i diferenciació del tub neural. A la zona anterior es formen tres vesícules: prosencèfal, mesencèfal i romboencèfal. Posteriorment, els mateixos processos produiran l'evolució d'aquestes estructures a l'estadi de cinc vesícules: el prosencèfal es divideix en el telencèfal i el diencèfal; i el romboencèfal es divideix en metencèfal i mielencèfal (Gilbert, 2006).

En el cas del prosencèfal, els processos de regionalització en l'eix dorso-ventral generen l'hipotàlem, els nuclis basals i el telencèfal, des de la zona ventral a la dorsal. A més a més, el còrtex i l'hipocamp provenen de la diferenciació del telencèfal.

En concret, la regionalització del còrtex és diferent. Inicialment es produeix a causa de l'acció conjunta de gradients de molècules de senyalització, principalment FGF8, que activa els gens *hox Pax6* o *Emx2*. Posteriorment, es produeix una adaptació a senyals exteriors que dona lloc a les diferents regions del còrtex: motor, sensorial, auditiu i visual (Sur and Rubenstein, 2005).

## 1.2 Formació del còrtex

En els mamífers, el còrtex és una estructura laminar agrupada formant 6 capes. Evolutivament és l'estructura més nova i més complexa del cervell. Està composta principalment per neurones i glia. Majoritàriament, el còrtex està format per les neurones piramidals (neurones excitatòries glutamatèrgiques) i les interneurons, (inhibitòries GABAèrgiques). Totes les neurones es generen en la neurogènesi. Trobem dos tipus de neurogènesi, la neurogènesi embrionària i la neurogènesi adulta. En l'embrionària, els precursors neuronals es localitzen al neuroepiteli de les zones adjacents als ventricles laterals, la zona ventricular (ventricular zone, VZ) i la zona subventricular (subventricular zone, SVZ) i generen els diferents tipus neuronals (Evsyukova et al., 2013; Marin et al., 2010) (figura I.1.2).



**Figura I.1.2. Esquema representatiu de la migració neuronal.** Les neurones de projecció tenen una migració radial des de la zona subventricular (SVZ), i les interneurons presenten una migració radial des de les zones de les eminències ganglionars (MGE i LGE). Les diferents neurones migren i formen la placa cortical (CP). Adaptat de (Marin et al., 2010).

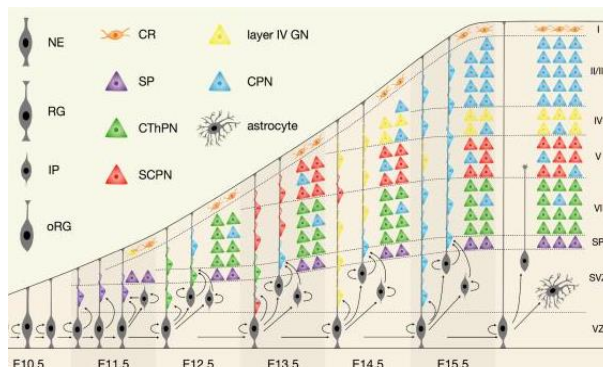
### 1.2.1 Neurones piramidals i migració radial

Les neurones piramidals de projecció es generen a la zona lateral del telencèfal. Des de la zona de neurogènesi, les neurones migren per posicionar-se correctament al còrtex en formació. El procés de formació del còrtex s'anomena corticogènesi. A l'inici d'aquest procés, els progenitors neuronals del neuroepiteli (NE) es divideixen de forma simètrica generant dos progenitors, expandint de manera ràpida el seu nombre. Els progenitors neuronals del còrtex també s'anomenen glia radial (radial glia, RG). La glia radial és un tipus cel·lular altament polaritzat. El soma es troba localitzat a la VZ i presenta dues extensions: una extensió apical ancorada a les meninges i una altra més curta que contacte amb la superfície del ventricle. Durant la corticogènesi, la glia radial pot presentar diversos tipus de divisions mitòtiques asimètriques (Barry et al., 2014; Evsyukova et al., 2013):

- **Divisions neurogèniques:** el progenitor es divideix donant lloc a un progenitor i una cèl·lula neuronal.
- **Divisió gliogènica:** el progenitor dona lloc a dues cèl·lules, una neuronal i l'altra de la glia.

- **Divisions asimètriques de progenitors:** es generen dos progenitors, un progenitor intermedi i un altre de glia radial.

Els progenitors intermedis (intermediate progenitors, IP) migren de la VZ a la SVZ, on es produeix una elevada activitat mitòtica. Els progenitors intermedis es divideixen donant lloc a dos progenitors intermedis o dos cèl·lules neuronals. Així doncs, la majoria de cèl·lules corticals provenen dels progenitors intermedis. Recentment, s'ha descobert un subtipus de progenitors neuronals que es localitzen a la zona més externa de la SVZ, anomenats glia radial exterior (outer radial glial cells, oRG) (Barry et al., 2014).



**Figura I.1.3. Esquema del model dins-fora de formació del còrtex en ratolí.**

Les neurones noves generades per la divisió de la glia radial (RG) migren i ocupen capes més superficials que les antigues neurones. Dia embrionari (E). Adaptat de (Greig et al., 2013)

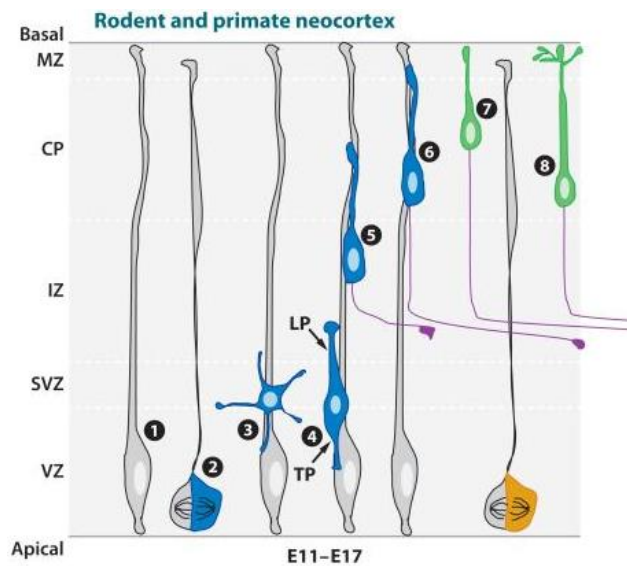
Les neurones generades migren de forma radial fins a la posició definitiva en el còrtex. Les primeres que es generen formen la preplaca cortical (preplate, PP), que, posteriorment, es divideix en dos: la subplaca cortical (SP) i la zona marginal (marginal zone, MZ). Aquesta divisió és fruit de la incorporació de les noves neurones que formen la placa cortical (cortical plate, CP). Les neurones es posicionen formant estructures laminars en un procés de dins cap a fora (inside-out model). D'aquesta manera, les cèl·lules generades inicialment ocupen capes més profundes del còrtex, i les generades posteriorment ocupen capes més superficials (**figura I.1.3**) (Evsyukova et al., 2013; Greig et al., 2013).

Les neurones de projecció corticals presenten dos tipus de migració radial (Kawauchi, 2015):

- **Translocació somal:** és una migració independent de la glia radial. En estadis molt primerencs de la corticogènesi, les neurones generades estenen una prolongació molt llarga que s'adhereix a la zona apical de les meninges. Aquesta extensió es redueix a mesura que el soma i la neurona es van desplaçant.
- **Locomoció:** és una migració que depèn de la glia radial. Les neurones generades en la VZ i la SVZ, s'adhereixen a la glia radial i l'utilitzen de suport per la migració. Les neurones que migren a través de locomoció presenten dues extensions, una apical i una basal de longitud molt més curta que en el cas de la translocació somal.

La migració radial de les neurones piramidals s'ha dividit en diferents estadis (**figura I.1.4**) (Evsyukova et al., 2013; Kawauchi, 2015):

1. La glia radial té un procés de mitosi.
2. Es genera una neurona a la VZ o a la SVZ.
3. La neurona migra fins a la zona compresa entre la SVZ i la zona intermèdia (intermediate zone, IZ). La neurona adquireix un fenotip multipolar. Presenten múltiples neurites que surten del soma.
4. Es produeix la polarització neuronal. De les múltiples neurites de la fase multipolar, una esdevé proto-axó i s'allarga en direcció ventral. Una altra prolongació s'elonga en direcció a les meninges. Al mateix



**Figura I.1.4. Esquema representatiu de la migració radial dependent de la glia radial.**

Les neurones generades a la VZ segueixen un passos concrets durant la migració radial dependent de glia radial. Adaptat de (Barnes and Polleux, 2009).

5. temps, es produeix una transició a fenotip bipolar. Aquests canvis impliquen diferents mecanismes cel·lulars, es produeix la formació del procés líder (leading process, LP) i del procés de cua (tailing process, TP).
6. La neurona estableix unions amb la glia radial que utilitzarà com a guia per la locomoció en direcció apical.
7. La neurona migra fins a contactar amb la MZ. Durant aquesta migració es produeixen processos d'estabilització del procés líder i la posterior retracció del procés de cua.
8. En la MZ, es produeix la translocació somal terminal. La molècula senyalitzadora, Reelina, activa una senyal intracel·lular que produeix la separació de la neurona de la glia radial.
9. La neurona es posiciona al destí final. Posteriorment, inicia processos de ramificació i arborització de l'arbre dendrític. La prolongació apical esdevé la dendrita apical i el proto-axó s'allarga fins a contactar amb la zona diana.

### 1.2.2 Interneurones i migració tangencial

Les interneurones inhibidores es generen a la zona medial i caudal del les eminències ganglionars (medial and caudal ganglionic eminences, MGE i CGE); i l'àrea preòptica (preoptic àrea, POA) de la zona ventral del telencèfal. Des d'aquestes regions, tenen una migració tangencial fins al còrtex (Marin and Rubenstein, 2003).

Trobem una gran heterogeneïtat d'interneurones a nivell electrofisiològic, molecular i morfològic. S'ha observat que el tipus d'interneurona i la seva posició en el còrtex és determinada pels factors de transcripció en les zones de neurogènesi (Marin et al., 2010). Les interneurones generades migren i penetren al còrtex des de la MZ, la SP o la IZ. A l'interior del còrtex es produeixen diferents tipus de migracions fins a la posició definitiva:

- Migració tangencial en múltiples direccions a l'interior del còrtex.

- Migració tangencial per la IZ, migració cap a les zones ventriculars i finalment migració radial per posicionar-se correctament.
- Migració tangencial i posterior migració radial per ocupar les capes corticals.

Els diferents tipus de migracions tangencials permeten el posicionament de les interneurons al llarg de tot el còrtex i ocupar les capes corresponents. D'aquesta manera, cada subtipus d'interneurons ocupa una zona concreta (Marin and Rubenstein, 2003; Marin et al., 2010).

### 1.3 Mecanismes moleculars generals en la migració

Durant els processos de migració, tant tangencial com radial, les neurones migren repetint tres estadis: extensió del procés líder, nucleoquinesi i retracció del procés de cua. En aquests processos trobem moltes proteïnes involucrades (figura 1.1.5).

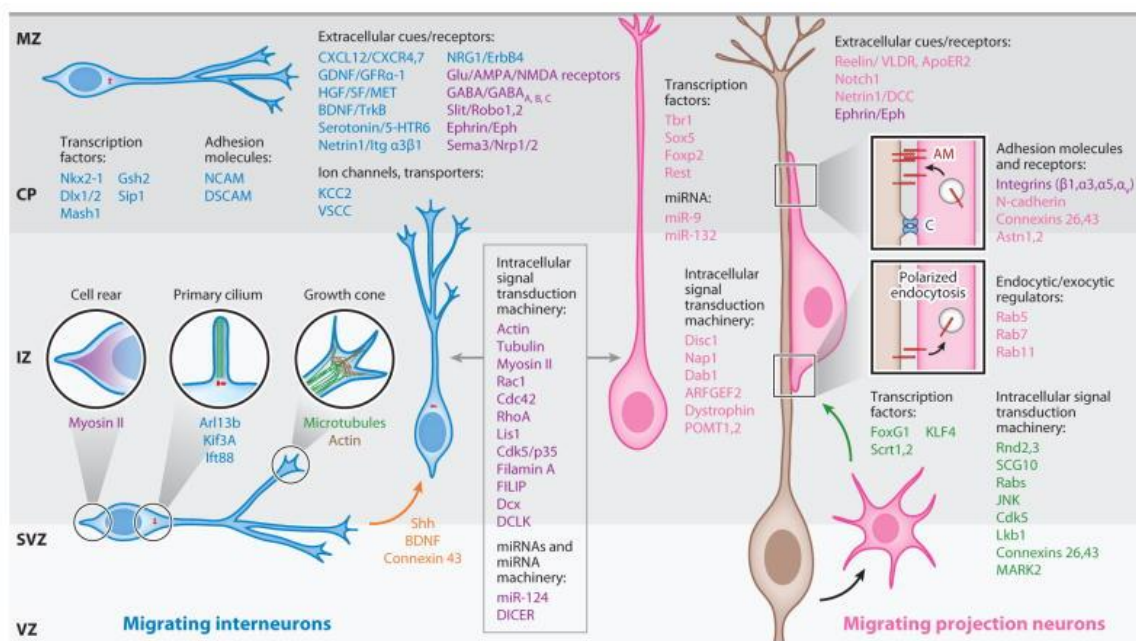


Figura 1.1.5. Molècules involucrades en la migració tangencial i radial.

En blau, les molècules involucrades en la migració tangencial. En rosa, les molècules involucrades en la migració radial. En lila, les molècules involucrades en els dos tipus de migració. En verd trobem aquelles molècules involucrades en la transició de multipolar a bipolar. Adaptat de (Evsykova et al., 2013).

#### 1.3.1 Leading process

L'extensió del LP de la neurona és depenent de la integració de les senyals externes. Aquestes senyals activen vies de senyalització que convergeixen en el control de les dinàmiques del citoesquelet d'actina i microtúbuls. Els canvis en el citoesquelet permeten l'orientació i el desplaçament de la neurona. Així doncs, la migració neuronal està regulada per una gran diversitat de proteïnes de senyalització (molècules de guia axonal, quimioattractants, quimiorepel·lents o quimiotàctics), receptors i proteïnes de matriu extracel·lular. La majoria dels mecanismes relacionats amb el processos d'extensió del procés líder són els mateixos que estan involucrats en els processos de creixement axonal i neuritogènesi (Greig et al., 2013).

#### 1.3.2 Nucleoquinesi

Durant la migració de la neurona és essencial que el nucli també es desplaci, procés anomenat nucleoquinesi (nucleokinesis) (figura 1.1.6). En la nucleoquinesi, es produeix un reordenament



del citoesquelet que facilita el desplaçament del nucli i el soma de la neurona. El centrosoma és l'òrganul responsable d'aquest moviment. Durant la nucleoquinesi, el nucli es troba envoltat d'una estructura de microtúbuls, ancorada al centrosoma. El moviment del centrosoma produeix un desplaçament de tota aquesta estructura. En aquest procés hi intervenen diferents proteïnes reguladores de la dinàmica de microtúbuls, com per exemple: DYN, DCX, 14-3-3ε o Lis-1. En concret, Lis-1 forma un complex amb la proteïna NDEL. Aquest complex i les proteïnes que regulen la seva activitat són claus pel desplaçament (Reiner and Sapir, 2013). A més a més, en aquest procés de nucleoquinesi estan involucrades molècules d'adhesió que interaccionen amb la glia radial i/o la matriu extracel·lular i el citoesquelet. Trobem diferents tipus de molècules d'adhesió que regulen el procés de nucleoquinesi, tant en la migració tangencial com en la radial (Kawauchi, 2015; Marin et al., 2010).

### 1.3.3 Tailing process

Paral·lelament a l'extensió del procés líder també es produeix la retracció del procés de cua. En aquest procés les dinàmiques d'actina i miosina són essencials per remodelar el citoesquelet. Aquest procés de retracció és diferent segons el tipus neuronal. En la migració radial, les neurones de projecció estenen un proto-axó a partir del procés de cua. Les interneurons, en canvi, tenen una petita prolongació distal (Evsyukova et al., 2013; Marin et al., 2010).

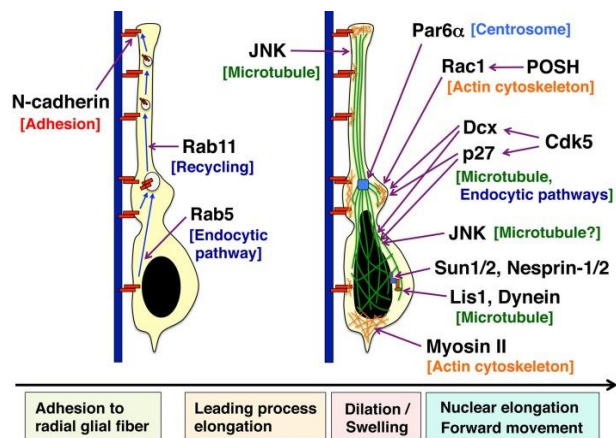


Figura I.1.6. Esquema del procés de locomoció.

En el procés de locomoció la neurona es desplaça al llarg de la glia radial. Aquest procés està regulat per diferents mecanismes, com per exemple els que regulen el citoesquelet de microtúbuls i actina. Adaptat de (Kawauchi, 2015).

### 1.3.4 Translocació somal

L'últim pas de la migració és la translocació somal terminal, procés en el qual les proteïnes d'adhesió i les proteïnes de matriu extracel·lular són molt importants. Cal destacar la glicoproteïna extracel·lular Reelina. Durant el desenvolupament, la Reelina és secretada per les cèl·lules Cajal-Retzius (CR) de la MZ (Soriano and Del Rio, 2005). En la locomoció, la Reelina facilita que les últimes neurones generades es posicionin en capes superiors, generant el model de dins-fora. Els receptors de Reelina, el receptor de lipoproteïnes de densitat molt baixa (very low density lipoprotein, VLDL) i el receptor d'apoliproteïna E2 (ApoER2), activen vies de senyalització que regulen la unió de les neurones amb la glia-radial. En concret, la Reelina regula la quantitat de N-cadherines present a la superfície de la neurona. En aquest sentit, la N-cadherina manté unida la neurona a la glia radial. Així doncs, quan la neurona arriba a la zona de la MZ l'acció de la Reelina redueix el nivell de N-cadherines a la membrana. Aquesta reducció produeix la translocació somal terminal (Jossin and Cooper, 2011).

El correcte desenvolupament del còrtex és essencial per a la connexió entre les neurones i el processament de la informació. Així doncs, és imprescindible una òptima neurogènesi i migració neuronal. Trobem moltes malalties relacionades amb problemes amb la neurogènesi

o en la migració, com per exemple la lissencefàlia, dislèxia, microencefàlia i macroencefàlia, esquizofrènia, autisme o epilèpsia (Evsyukova et al., 2013).

En els últims anys, s'ha descrit diverses proteïnes involucrades en els processos de formació del còrtex. L'avanç tècnic ha facilitat l'estudi a nivell *in vivo*. En concret, una de les tècniques utilitzada per l'estudi de la formació del còrtex és l'electroporació *in utero*. Aquesta tècnica permet marcar i/o manipular l'expressió gènica de les neurones que s'estan generant en un estadi concret del desenvolupament cortical i estudiar-ne l'evolució. Així doncs, aquesta tècnica ha permès comprendre la funció de moltes proteïnes en la migració neuronal, com per exemple L1cam (Kawauchi, 2015; Kishimoto et al., 2013; Nishimura et al., 2012).

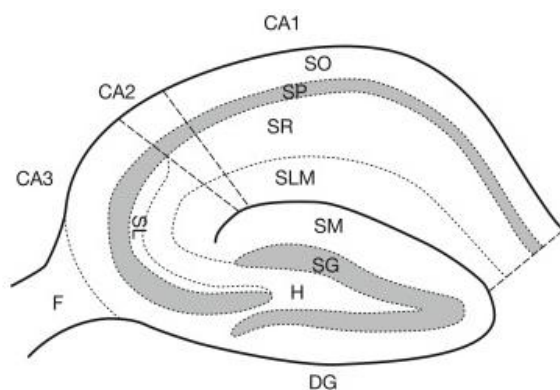
## 1.4 Formació de l'hipocamp

L'hipocamp, conjuntament amb el còrtex, és una de les regions evolutivament més noves. Es tracta d'una estructura amb una elevada heterogeneïtat cel·lular, que forma una estructura laminar concreta amb una connectivitat característica que permet l'aprenentatge i la memorització de nous contextos espaials. (Forster et al., 2006)

### 1.4.1 Anatomia

L'hipocamp es divideix en diferents regions formades per poblacions neuronals amb diferents característiques morfològiques i electrofisiològiques. Aquestes regions són el gir dentat (*dentate gyrus*, DG), el *cornu ammonis* (CA) i la fimbria. La CA es divideix en tres zones segons diferents marcadors histològics, connectivitat o electrofisiologia: la CA1, la CA2 i la CA3. Aquestes zones contenen diferents estrats segons la densitat neuronal, el tipus neuronal i les projeccions que reben (**figura I.1.7**). Els cossos neuronals es localitzen al *stratum pyramidale* i les seves dendrites s'extenen al llarg dels diferents estrats. En concret, la CA1 es divideix en 4 estrats: *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiatum*, *stratum lacunosum-moleculare*. Trobem dendrites basals a la zona del *stratum oriens* i dendrites apicals al *stratum radiatum* i *lacunosum-moleculare*. A cada estrat, les dendrites realitzen connexions amb axons provinents de diferents regions. El gir dentat conté el *stratum moleculare*, *stratum granulosum* i l'*hilus*. Les neurones granulars es localitzen al *stratum granulosum*, les dendrites s'estenen a la zona del *stratum moleculare* i els axons formen les fibres molsoses (mossy fibres, MFs). Aquestes fibres creuen l'*hilus* i projecten al *stratum lucidum* de la CA3. A l'*hilus* també trobem interneurons.

A més a més, la formació hipocàmica està formada per més regions a part de l'hipocamp: el subicle, el presubicle, el parasubicle i l'escorça entorínica.



**Figura I.1.7. Esquema de l'estructura i la laminació de l'hipocamp.**

L'hipocamp està dividit en diferents estrats segons el tipus neuronal i les connexions que es realitzen.

CA, cornu ammonis; DG, dentate gyrus; F, fimbria; H, hilus; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; SLM, stratum lacunosum-moleculare; SL, stratum lucidum; SM, stratum moleculare; SG, stratum granulosum.

### 1.4.2 Desenvolupament

La formació de l'hipocamp és temporalment més tardana que el còrtex, però presenten molts paral·lelismes. En estadis molts primerencs a l'embriogènesi es forma el *plexus choroide*, un plegament del telencèfal a la zona medial. L'acció de les molècules de senyalització produeix la regionalització i diferenciació del *plexus choroide*, com per exemple l'acció de Wnt o BMPs. Aquest procés dona lloc als progenitors neuronals de l'hipocamp (Khalaf-Nazzal and Francis, 2013).

Durant els primers estadis de la formació, les cèl·lules CR envaeixen l'hipocamp en formació i es localitzen a la MZ (Soriano et al., 1994). Igual que al còrtex, la Reelina secretada per les CR és essencial per la correcta migració i posicionament de les neurones. La glia radial també té una funció dual: es tracta dels progenitors neuronals i al mateix temps actua de suport en la migració radial (Alcantara et al., 1998; Del Rio et al., 1997). En el cas de la CA, les neurones piramidals es generen en una regió extensa en la VZ, el neuroepiteli hipocampal (hippocampal neuroepithelium, HNE). La formació de la CA segueix el model dins-fora amb una migració radial. En concret, s'observa un retard temporal en la formació de les diferents zones de la CA. Així doncs, la CA1 es genera més aviat que la CA3 (Forster et al., 2006). A més a més, les neurones de la CA3 pròximes al DG tenen una migració tangencial abans d'iniciar la migració radial (**figura I.1.8**).

Per altra banda, la neurogènesi i la migració de les neurones del DG són característiques. Les neurones del DG es generen temporalment més tard. Els precursors es localitzen en un neuroepiteli a la zona adjacent de la fimbria, que rep el nom de neuroepiteli dentat (dentate neuroepithelium, DNE). Els progenitors es divideixen de forma simètrica o asimètrica. La formació del DG segueix els següents passos (**figura I.1.8**):

1. Les neurones generades al neuroepiteli adquireixen un fenotip multipolar i formen una matriu secundària.
2. Les neurones tenen un canvi a fenotip bipolar i migren de forma tangencial, vorejant la zona lateral.
3. Les neurones contacten amb les CR de la MZ. A part de la Reelina, les CR expressen altres factors quimioattractants, com el Sdf1, que aturen i agrupen les neurones, formant una matriu terciària.
4. Les neurones agrupades migren radialment per formar la capa supra-granular del DG.
5. Posteriorment es forma la capa infra-granular del DG, que és l'última en formar-se.

A diferència de les neurones del còrtex i de la CA, les neurones del DG no segueixen un model de dins-fora, sinó un model de fora-dins. D'aquesta manera, les neurones generades en els estadis més primerencs es posicionen a la capa més externa.

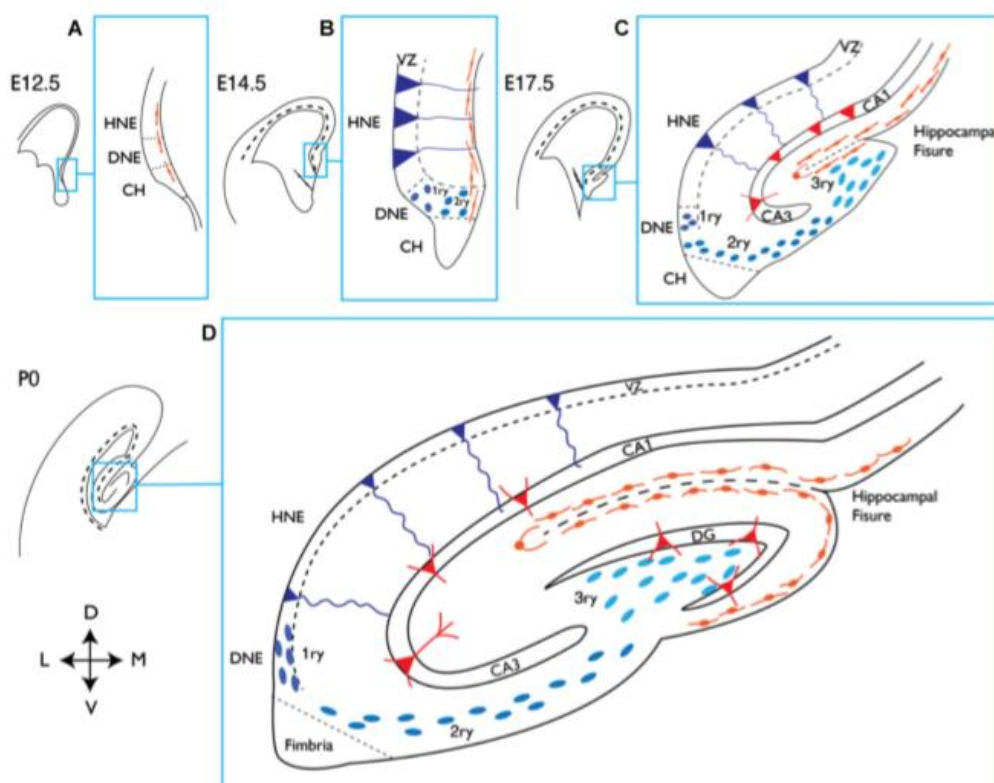
Les neurones que formen el gir dentat tenen diferents migracions, per això es creu que hi ha diferents tipus de glia radial que faciliten els diferents tipus de migració. En concret, trobem la migració tangencial i la radial dependent de la glia radial. Aquests tipus estan modulats per proteïnes, com per exemple la Reelina i *Nf1b* (Alcantara et al., 1998; Barry et al., 2008; Forster et al., 2006; Zhao et al., 2004).

Paral·lelament a la migració de les neurones, trobem una migració de progenitors que envaeixen la zona del DG en formació. Un percentatge de les neurones del DG provenen de la neurogènesi en la zona subgranular (sub-granular zone, SGZ) de l'hipocamp. En concret, provenen dels progenitors que han migrat durant la formació de l'hipocamp. Aquests progenitors presenten una elevada activitat mitòtica durant la formació del DG. Amb el pas del

temps, la taxa de divisió es redueix, però no desapareix. La població de progenitors que queda en la SGZ dona lloc a la neurogènesi adulta en l'hipocamp.

Igual que al còrtex, a l'hipocamp hi ha una elevada heterogeneïtat d'interneurons. Aquestes es generen a la mateixa regió que les interneurons del còrtex, a les eminències ganglionar, i a través d'una migració tangencial per la MZ i la IZ penetren a la zona de l'hipocamp. La migració tangencial de les neurones hipocampals és temporalment més llarga que en les interneurons del còrtex, ja que han de recórrer més distància. Posteriorment, a l'interior de l'hipocamp es produeixen diferents tipus de migracions que faciliten el posicionament al lloc corresponent. Trobem una elevada heterogeneïtat d'interneurons que produeixen connexions molt específiques (Danglot et al., 2006; Marin et al., 2010).

Generalment, els mecanismes i les molècules involucrats en la migració de les neurones hipocampals són iguals que en el cas del còrtex. Errors en aquests mecanismes originen diferents tipus de patologies en la formació d'aquestes estructures, com per exemple la lissencefàlia o l'autisme (Marin et al., 2010).



**Figura I.1.8. Esquema de la formació del cornus ammonis i el gir dentat.**

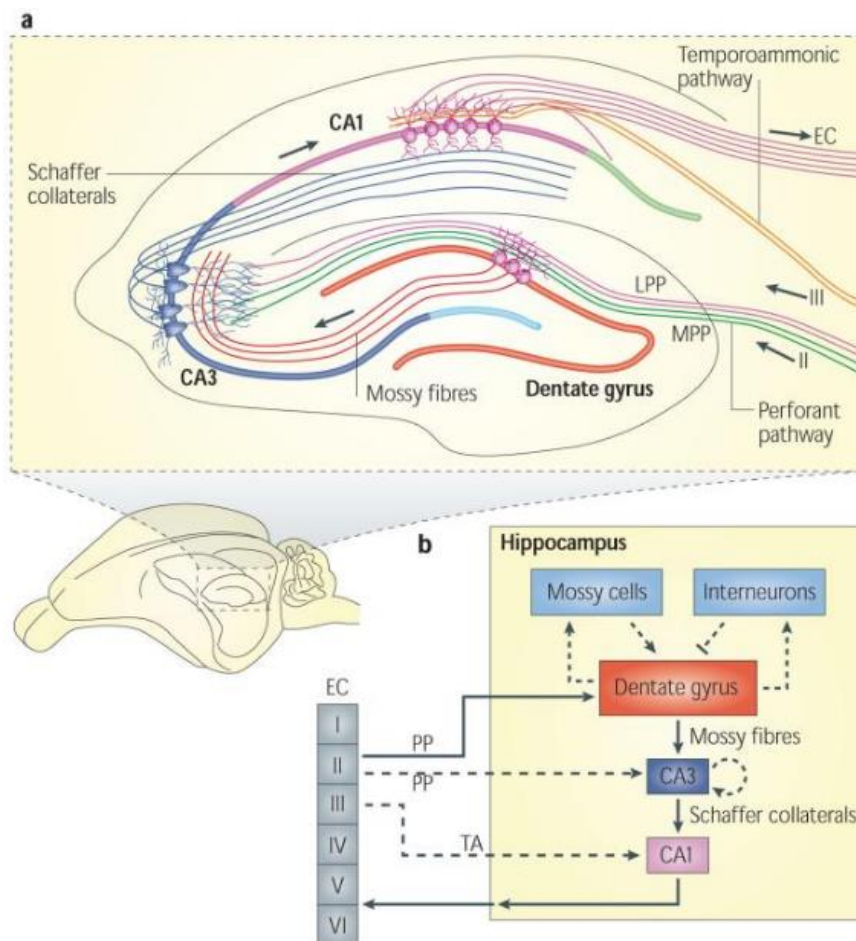
En estadis primerencs en la formació de l'hipocamp, E14.5, la glia radial es localitza a la VZ i es divideix per donar les cèl·lules de la CA. A la zona apical trobem les CR, de color vermell, que facilitaran la formació i estratificació de les diferents capes de l'hipocamp. Els progenitors del gir dentat es localitzen al DNE, i es divideixen i migren formant una matriu secundària.

A E17.5, els progenitors del gir migren i s'acumulen a la fissura hipocàmpica formant una matriu terciària. Les neurones de la CA migren de forma radial des de la zona de la HNE, ocupen les posicions corresponents.

A P0, les neurones que formaran el gir a través d'una migració radial guiada per les CR es posicionen, primer formant la capa supra-granular i posteriorment formant la infra-granular. Per la correcta formació de les dues capes és necessària la migració de les CR al llarg de la superfície. Els progenitors queden restringits a la matriu terciària, on són actius al llarg dels estadis postnatsals. Aquests progenitors donaran lloc a la neurogènesi adulta. Adaptat de (Khalaf-Nazzal and Francis, 2013).

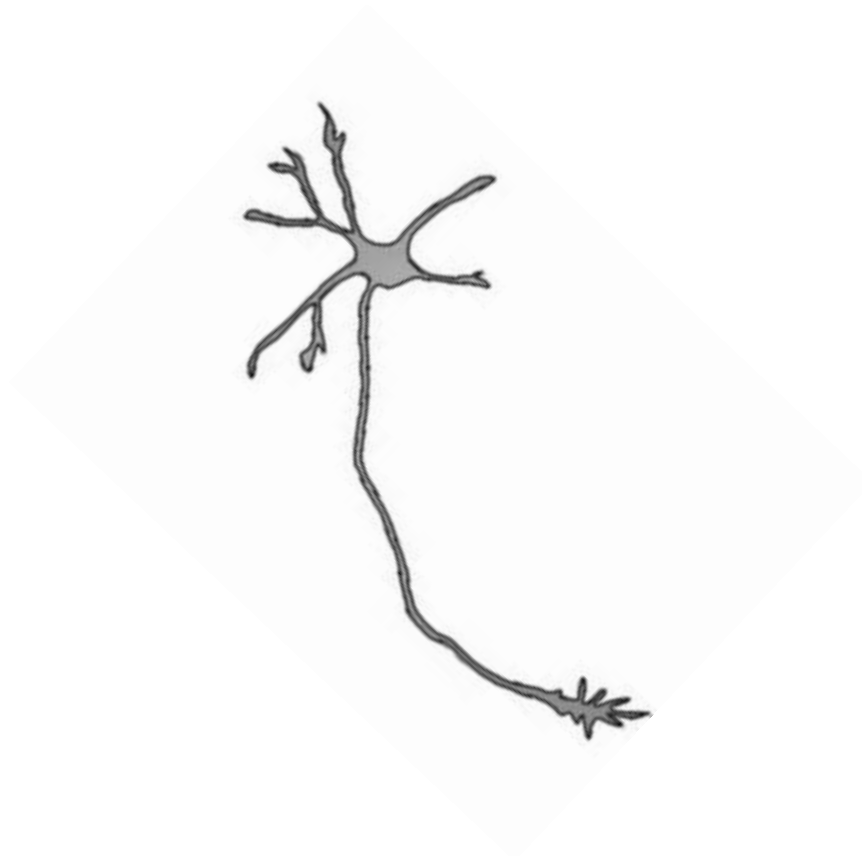
### 1.4.3 Connectivitat

La connectivitat dels circuits hipocàmpals ha estat extensament estudiada degut a la seva implicació en la memòria i l'aprenentatge espacial. D'aquesta manera, es coneix que l'hipocamp es connecta de forma específica i principalment unidireccional amb un circuit anomenat trisinàptic (**figura I.1.9**). En concret, les neurones de l'escorça entorínica projecten els axons (informació sensorial) a la zona del DG i la CA3 a través de la via perforant. A més a més, les neurones del DG projecten els axons a la CA3 a través de les MFs. Les MFs contacten amb les dendrites de les neurones de la CA3, amb les cèl·lules molsoses i les interneurons de l'hilus. Les neurones piramidals de la CA3 projecten a la CA1 i la CA3 a través de les fibres col·laterals de Schaffer. Al mateix temps, les neurones de CA1 projecten al subicle i a les capes profundes de l'escorça entorínica. Alhora, l'escorça entorínica torna a projectar a les àrees de l'hipocamp. D'aquesta manera la informació sensorial és processada pel circuit trisinàptic i retornada a les zones del còrtex. (Deng et al., 2010; Forster et al., 2006; Neves et al., 2008).



**Figura I.1.9.** Esquema del circuit trisinàptic de la formació hipocàmpica. Les diferents regions de la formació hipocàmpica estan connectades de forma unidireccional formant el circuit trisinàptic. Aquest circuit serveix per processar la informació sensorial que arriba a l'escorça entorínica. Adaptat de (Deng et al., 2010).

## 2. Polarització neuronal



Les neurones són cèl·lules diferenciades amb una citoarquitectura molt característica. Degut a la diferenciació i maduració de la cèl·lula s'originen diferents subdominis cel·lulars amb un citoesquelet i una dinàmica característica que permet a la neurona tenir la capacitat de modular i transmetre les senyals.

Les neurones són cèl·lules altament polaritzades. Presenten dos compartiments molt diferenciats: les dendrites i els axons, que es diferencien tant a nivell morfològic com bioquímic amb estructures i proteïnes característiques de cada compartiment. La formació i la diferenciació d'aquests dos compartiments són essencials per poder realitzar contactes que donen lloc a circuits neuronals que permeten la integració i el processament de la informació. Aquesta compartimentalització es produeix durant la diferenciació neuronal i s'anomena polarització neuronal (Barnes and Polleux, 2009; Takano et al., 2015).

## 2.1 Polarització neuronal

La polarització neuronal és el procés pel qual, degut a diferents processos que tenen lloc de forma estocàstica en la cèl·lula neuronal postmitòtica, s'originen uns desequilibris en les dinàmiques del citoesquelet que produeixen la formació dos compartiments diferenciats: l'axó i les dendrites. Els dos compartiments tenen una composició i un funcionament diferent. Així doncs, els axons transmeten la senyal a través de potencials d'acció fins al botons sinàptics, on alliberen els neurotransmissors. Aquests són integrats als compartiments postsinàptics de les dendrites, on s'originen potencials elèctrics que es transmeten al llarg del compartiment somatodendrític fins al segment inicial de l'axó, on es produeix el potencial d'acció. (Arimura and Kaibuchi, 2007; Funahashi et al., 2014).

La polaritat neuronal es manté al llarg del temps i és essencial per conservar els compartiments que permeten la connexió entre neurones. D'aquesta manera, el correcte manteniment de la polaritat neuronal permet múltiples funcions bàsiques com el tràfic vesicular, la síntesi, degradació proteica específica i la transmissió dels potencials d'acció (Bentley and Banker, 2016; Rasband, 2010).

La polarització neuronal és un procés molt important per la diferenciació i maduració neuronal; per això és un procés molt estudiat. Inicialment, es van fer estudis amb models neuronals *in vitro*. Aquests estudis aportaven, i aporten, informació sobre els mecanismes intrínsecs de les neurones que donen lloc a la polarització. A mesura que les tècniques han evolucionat s'han pogut utilitzar diferents eines *in vivo*, tals com animals modificats genèticament o l'electroporació *in utero*. D'aquesta manera s'han pogut corroborar les hipòtesis *in vivo* i demostrar la funció de diferents senyals extracel·lulars (Arimura and Kaibuchi, 2007; Sakakibara and Hatanaka, 2015; Takano et al., 2015).

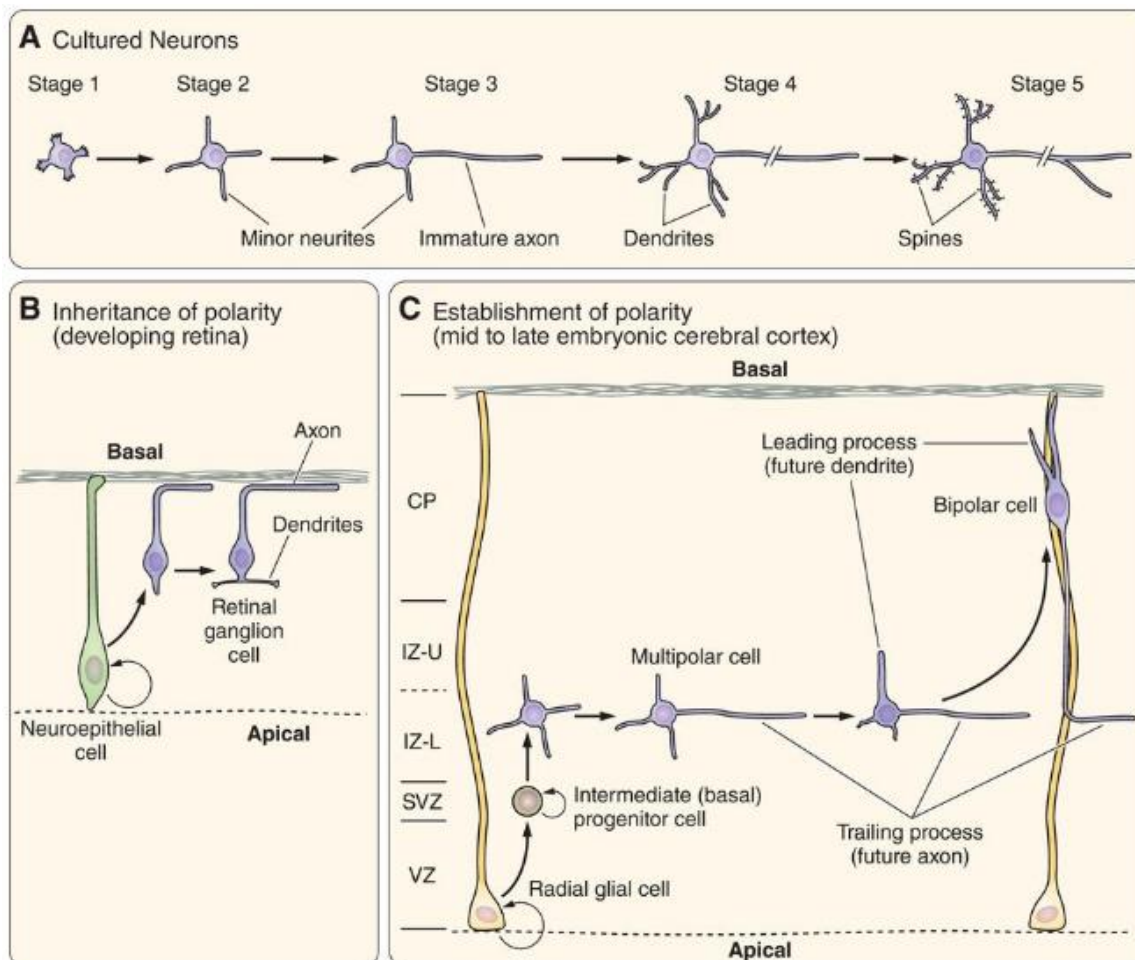
### 2.1.1 *In vitro*

*In vitro* s'han utilitzat diferents models: cèl·lules ganglionars de la retina, cèl·lules de cerebel, cèl·lules del còrtex o hipocampals. Els mecanismes essencials que regulen la polarització neuronal en els diferents models neuronals són semblants (Tahirovic and Bradke, 2009).

El procés de polarització neuronal es divideix en 6 estadis en cultius hipocampals de ratolí, segons Banker i els seus companys (Craig and Banker, 1994; Dotti et al., 1988; Kaech and Banker, 2006) (**figura 1.2.1.A**) :

- **Estadi 1** (després de plantar les cèl·lules): la neurona contacta amb la superfície, té una morfologia rodona i forma un lamel·lipodi i algun fil·lopodi.
- **Estadi 2** (de 0,5 fins a 1,5 dies): la neurona comença a formar petites neurites amb cons de creixement dinàmics que s'allarguen i es retrauen a gran velocitat.
- **Estadi 3** (de 1,5 fins a 3 dies): l'esdeveniment més important per la polarització té lloc en aquest estadi. Una de les neurites té un creixement molt ràpid i esdevé axó.

- **Estadi 4** ( de 3 fins a 7): en aquest estadi les neurites restants es desenvolupen formant les dendrites. Trobem diferents processos involucrats per incrementar el tamany de la neurona: creixement morfològic de la neurona, elevada síntesi proteica, tràfic vesicular i incorporació de vesícules a la membrana.
- **Estadi 5** ( de 7 fins a 15 dies): es produeix la polarització funcional de les dendrites i els axons, i es formen contactes sinàptics.



**Figura 1.2.1. Esquema representatiu del procés de polarització neuronal *in vitro* i *in vivo*.**

A) Estadi 1 (després de plantar les cèl·lules), la neurona contacta amb la superfície, té una morfologia rodona. Estadi 2 (de 0,5 fins a 1,5 dies), la neurona comença a formar petites neurites amb cons de creixement dinàmics. Estadi 3 (de 1,5 fins a 3 dies), una de les neurites té un creixement molt ràpid i esdevé axó. Estadi 4 ( de 3 fins a 7 dies): en aquest estadi les neurites restants es desenvolupen formant les dendrites. Estadi 5 ( de 7 fins a 15 dies) es produeix la polarització funcional de les dendrites i els axons, es formen contactes sinàptics.

B) Polarització heretada, característic de les neurones ganglionars de la retina. La polaritat neuronal depèn de la polaritat dels progenitors.

C) Polaritat espontània en neurones corticals. Les neurones generades a la VZ migren fins a la IZ on adquireixen un fenotip multipolar amb diferents neurites que surten del soma. La polarització neuronal es produeix i una de les neurites creix ràpidament i esdevé TP, una altre neurita esdevé LP, aquestes prolongacions donaran lloc a l'axó i les dendrites, respectivament.

Adaptat de (Namba et al., 2015).



Els principals desavantatges dels cultius *in vitro* com a model per l'estudi de polarització són:

1. Les neurones quan són dissociades del teixit ja formen neurites, per tant, tenen un procés de desdiferenciació per tornar a polaritzar la neurona. D'aquesta manera, el procés de polarització *in vitro* no és *de novo*, sinó que existeixen estructures formades prèviament. Així doncs, les cèl·lules plantades només reorganitzen aquestes estructures.
2. Mai tenen les senyals externes i les condicions ambientals de l'hipocamp en formació.

Tot i això, les neurones *in vitro* presenten un procés de polarització regulat per mecanismes comuns *in vivo*. Les vies de senyalització i moltes proteïnes involucrades en la polarització tenen el mateix efecte *in vitro* i *in vivo*.

### **2.1.2 In vivo**

La polarització neuronal en el cervell difereix en alguns aspectes de la polarització *in vitro*, depenent de la regió i de l'estadi del desenvolupament. *In vivo*, la polarització neuronal és simultània a la migració, com hem vist al apartat de "Formació del còrtex".

La polarització *in vivo* es pot dividir en dos models: la polarització heretada i la polarització espontània (**figura 1.2.1**) (Namba et al., 2015).

La polarització heretada és poc freqüent. És present, per exemple, en les cèl·lules ganglionars de la retina (**figura 1.2.1.B**). En aquestes cèl·lules, la polaritat depèn de la polaritat dels progenitors neuronals. En concret, l'orientació baso-apical dels progenitors determinarà la formació dels dos compartiments en les cèl·lules descendents.

Per altra banda, la polarització espontània es produeix, entre altres, en les neurones glutamatèrgiques del còrtex i l'hipocamp (**figura 1.2.1.C**). Les neurones generades a la VZ migren fins a la IZ, on adquireixen un fenotip multipolar amb diferents neurites que surten del soma semblant a l'estadi 2 de Banker. Normalment, la polarització neuronal es produeix quan una de les neurites creix ràpidament i esdevé TP i una altra neurita esdevé LP. Aquestes prolongacions donaran lloc a l'axó i les dendrites, respectivament. En el moment en que es defineixen els compartiments, les altres neurites es retrauen, i es produeix la transició del fenotip multipolar a bipolar. Normalment *in vivo* es defineix primer el TP i després el LP, tot i que trobem neurones en les quals es defineix primer el LP i posteriorment el TP. Aquest grup representa un 30% respecte el total de neurones (Takano et al., 2015).

## 2.2 Mecanismes intracel·lulars en la polarització neuronal

La polarització neuronal està regulada per diferents senyals extracel·lulars i intracel·lulars. A nivell intracel·lular tenim diferents mecanismes i vies de senyalització involucrades, la majoria de les quals modifiquen les dinàmiques del citoesquelet (Barnes and Polleux, 2009; Tahirovic and Bradke, 2009).

### 2.2.1 Citoesquelet

El citoesquelet és essencial per la compartimentalització, el tràfic de vesícules i el manteniment de la polarització neuronal. A més a més, la majoria dels mecanismes involucrats en la regulació del citoesquelet són comuns *in vitro* i *in vivo* (Takano et al., 2015).

En concret, els filaments d'actina i els microtúbuls tenen dues propietats que els fa claus en la polaritat neuronal (Tahirovic and Bradke, 2009):

- La polaritat intrínseca de les seves fibres, que permet un reordenament i una orientació.
- Convertir les diferents senyals extracel·lulars en canvis estructurals.

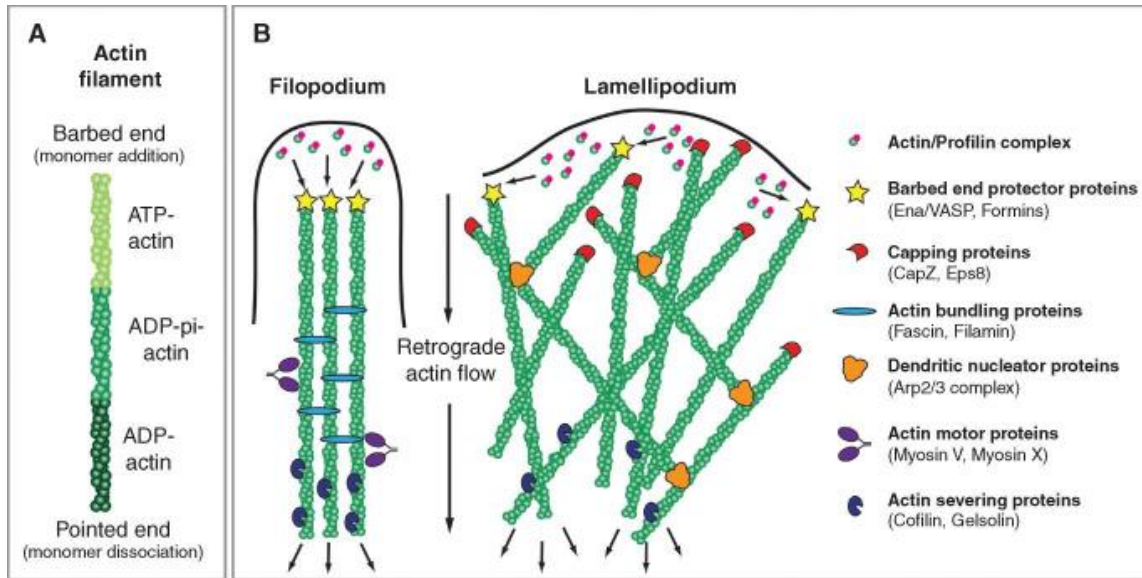
El reordenament del citoesquelet d'actina i microtúbuls és clau a l'inici de la polarització neuronal, pas de l'estadi 2 al 3 de Banker. Així doncs, abans que els canvis morfològics siguin visibles, la neurita que esdevindrà axó presenta un elevat dinamisme al con de creixement, amb un elevat recanvi d'actina. Les neurites que donaran lloc a les dendrites, en canvi, presenten uns cons de creixement més estàtics amb un actina menys mòbil que evita l'entrada dels microtúbuls. Aquesta entrada és clau per l'estabilització de les estructures. A més a més, els microtúbuls són menys estables en les neurites que donaran lloc a les dendrites que en les neurites que donaran lloc a l'axó (Barnes and Polleux, 2009; da Silva and Dotti, 2002; Tahirovic and Bradke, 2009).

#### 2.2.1.1 Proteïnes reguladores d'actina

Els filaments d'actina són estructures formades per la unió de dos polímers helicoïdals d'actina. Els monòmers d'actina s'uneixen a l'extrem positiu en forma de ATP-actina i es desuneixen a l'extrem negatiu en forma de ADP-actina. Els filaments d'actina són el component clau en la formació dels lamel·lipodis i els fil·lopodis. En concret, els filaments d'actina dels lamel·lipodi formen estructures molt ramificades, en canvi en els fil·lopodis hi són en forma d'estructures paral·leles. L'estabilitat i les dinàmiques d'actina estan controlades per moltes proteïnes. La regulació d'aquestes proteïnes és clau per trencar la simetria neuronal, i donar lloc a l'inici de la polaritat neuronal (Dent et al., 2011; Tahirovic and Bradke, 2009)

Trobem moltes proteïnes involucrades en les dinàmiques d'actina. Algunes proteïnes rellevants a nivell neuronal són (**figura 1.2.2**):

- **Ramificació:** Arp2/3 és un complex proteic essencial per la ramificació de les estructures d'actina que donen lloc als lamel·lipodis. S'uneix als extrems negatius de les fibres estabilitzant les ramificacions.
- **Fasciculació:** Fascin i Filamin són proteïnes d'unió a actina que participen en la formació de feixos paral·lels d'actina en els fil·lopodis.
- **Nucleació:** WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein [WASP]-family verprolin-homologous protein), proteïna que dona nom al complex de WAVE que es localitza als lamel·lipodi i regula la polimerització d'actina a través de Arp2/3 o Profilin II. Aquest complex promou el creixement axonal.



**Figura 1.2.2. Esquema representatiu de la dinàmica del citoesquelet d'actina.**

A) Els filaments d'actina, són estructures formades per la unió de dos polímers helicoidals d'actina. Els monòmers d'actina s'uneixen a l'extrem positiu en forma de ATP-actina i es desuneix al extrem negatiu en forma de ADP-actina.

B) Els filaments d'actina són els components claus en els lamel·lipodis i filopodis. En els lamel·lipodis l'actina forma estructures molt ramificades, en canvi els filopodis les estructures formades són paral·leles. Trobem moltes proteïnes associades al citoesquelet d'actina. Profilin s'uneix a actina i facilita la polimerització. Les proteïnes protectores del extrem positiu, ENA/VASP, faciliten la polimerització. Proteïnes d'encaputxament, CapZ, evita la polimerització unint-se al extrem positiu dels filaments d'actina. Proteïnes nucleadores, Arp2/3, claus per formar ramificacions en l'estructura en els lamel·lipodis. Proteïnes despolimeritzadores, cofilina, s'uneixen amb afinitat a l'ADP-actina en les fibres. Proteïnes motores associades actina, miosines, participen en la contracció dels filaments d'actina necessaris per la mobilitat del con de creixement. Adaptat de (Dent et al., 2011).

ENA(enable)/VASP(vasodilator stimulated phosphoprotein), localitzat a l'extrem positiu dels filaments d'actina, promou la polimerització i és rellevant en la formació de neurites.

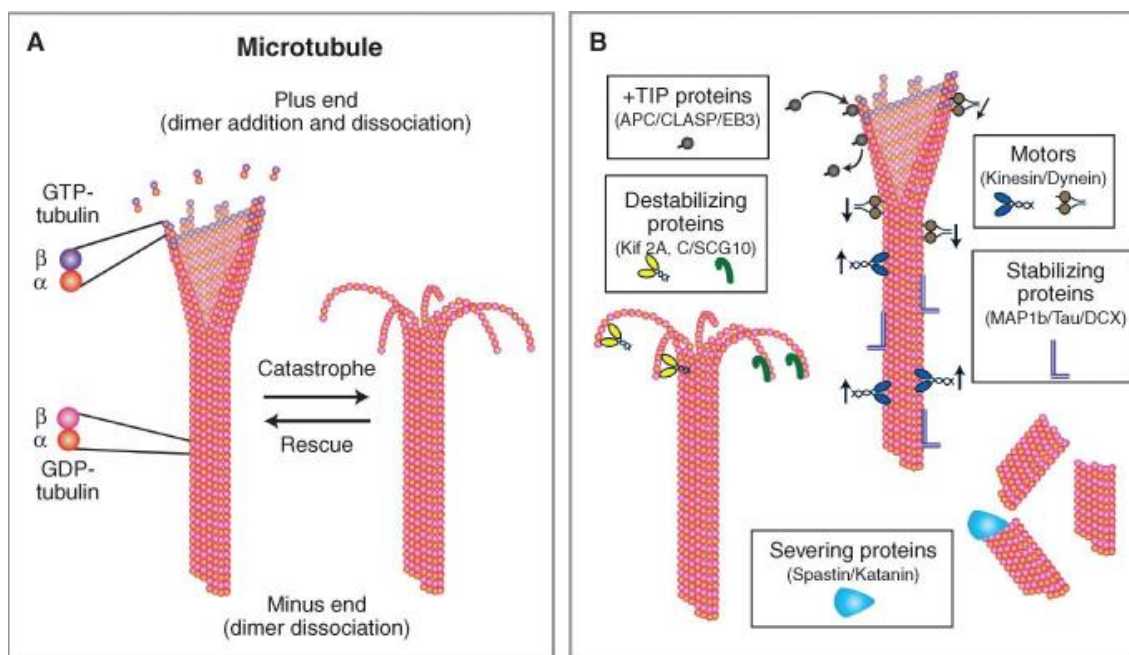
Profilin II (isoforma neuronal de profilin), es localitza a les parts més externes del con de creixement i afavoreix la formació dels monòmers ATP-F-actina que s'incorporen als extrems.

- **Encaputxament:** CapZ, s'uneix a l'extrem positiu dels filaments i bloqueja la polimerització. Aquesta funció és necessària per mantenir el dinamisme d'actina. CapZ també es pot unir als microtúbuls.
- **Despolimerització:** ADF i Cofilina s'uneixen amb major afinitat a l'extrem negatiu dels filaments d'actina, presentant una major afinitat per ADP-actina. Produeixen la despolimerització, presentant una major activitat d'aquestes proteïnes al con de creixement axonal, que permet una dinàmica d'actina elevada.

El citoesquelet d'actina també té associades proteïnes motores, les miosines. Miosina II és una proteïna d'aquesta família que promou la contracció dels filaments d'actina i facilita la mobilitat del con de creixement. També actua com a proteïna despolimeritzadora. Les dues funcions són claus pel con de creixement i el desenvolupament de les neurites.

### 2.2.1.2 Proteïnes reguladores dels microtúbuls

Els microtúbuls són estructures molt inestables, formades per heterodímers de tubulina, que s'uneixen a l'extrem positiu. Els microtúbuls combinen fases de creixement i de contracció, conegudes també com a fases de rescat i de catàstrofe, respectivament. Igual que l'actina, els microtúbuls tenen moltes proteïnes associades (microtubule-associated proteins, MAPs) que regulen la seva estabilitat. De totes les MAPs, la Map2 i la Map1B són especialment importants en la polarització neuronal, ja que interaccionen tant amb els microtúbuls com amb l'actina.



**Figura 1.2.3. Esquema representatiu de la dinàmica del citoesquelet de microtúbuls.**

A) Els microtúbuls, són estructures molt inestables, formats per heterodímers de tubulina que s'uneixen a l'extrem positiu. Els microtúbuls combinen fases de creixement i de contracció, conegut també com a fases de rescat i de catàstrofe, respectivament.

B) Trobem moltes proteïnes associades al citoesquelet de microtúbuls. Proteïnes estabilitzadores, APC/CLASP/EB3, s'uneixen a l'extrem positiu i eviten la despolimerització. Proteïnes desestabilitzadores, KIF2A/ SCG10, promouen la despolimerització de les fibres. Proteïnes de tall, Spastin o Katanin, tallen els microtúbuls. Proteïnes motores associades actina, miosines, participen en la contracció dels filaments d'actina necessaris per a la mobilitat del con de creixement. Adaptat de (Dent et al., 2011).

L'estabilitat dels microtúbuls és clau en la polarització neuronal. Degut a la inestabilitat intrínseca dels microtúbuls, s'han descrit un major nombre de proteïnes involucrades en l'estabilització dels microtúbuls que de proteïnes desestabilitzadores. En aquest sentit, les proteïnes importants en la polarització neuronal són (**figura 1.2.3**):

- **Estabilització:** són proteïnes que interaccionen amb l'extrem positiu i eviten la despolimerització. Hi ha diferents proteïnes amb aquesta funció anomenades proteïnes d'encaputxament de l'extrem positiu (plus-end tracking proteins, +TIPs), com CRMP-2, APC, CLAP, o la proteïna d'unió final 1/3 (end-binding protein 1/3, EB1/3). Hi ha proteïnes estabilitzadores que s'uneixen a l'estructura de microtúbuls i eviten l'accés de les proteïnes desestabilitzadores, com Disc1, Doublecortin, Tau, Map1B o Map2.
- **Desestabilització:** són proteïnes que promouen la despolimerització. Alguns exemples són SCG10, SCLIP, Stathim, Op18 o KIF2A.

- **Tall:** Katanin i Spastin tallen els microtúbuls, contribuint a la desestabilització del citoesquelet. Aquestes proteïnes són importants en la formació de les neurites i la ramificació axonal.

També trobem proteïnes involucrades en el tràfic que estan associades als microtúbuls. Les proteïnes motores associades als microtúbuls són les dineïnes i les cinesines. Aquestes proteïnes són claus pel transport, tant en dendrites com axó, i en el manteniment de la polaritat neuronal.

A més a més, la tubulina presenta modificacions postraduccionals que modifiquen l'estabilitat dels microtúbuls. Les modificacions més estudiades a nivell neuronal i amb major rellevància en la polaritat neuronal són l'acetilació, la tirosinació i la poliaminació.

La tirosinació és la unió d'una tirosina a la  $\alpha$ -tubulina. Aquesta modificació facilita la unió als microtúbuls de proteïnes desestabilitzadores, com KIF2A.

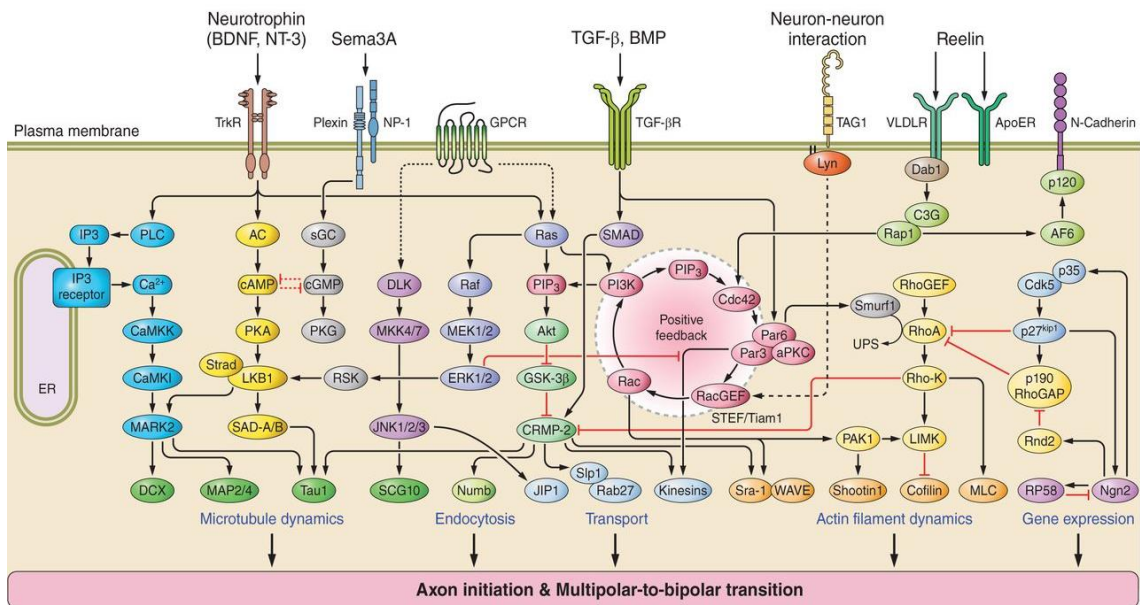
La poliaminació de la  $\beta$ -tubulina, a través de les glutaminases, estableix els filaments. En aquest sentit, l'increment de calci intracel·lular produeix l'activació de les glutaminases.

L'acetilació de la tubulina és una causa de l'estabilització dels microtúbuls. A diferència de les altres modificacions postraduccionals, l'acetilació només es produeix quan els microtúbuls són estables. Així doncs, la modificació es produeix quan la tubulina està unida en forma de fibres i no en forma monomèrica.

D'aquesta manera, el control de les proteïnes involucrades en les modificacions postraduccionals de tubulina és clau per la correcta formació dels microtúbuls i la seva dinàmica de polimerització i despolimerització durant el desenvolupament neuronal.

## 2.2.2 Vies de senyalització

Hi ha moltes vies de senyalització involucrades en la polarització neuronal. La majoria d'elles convergeixen en la regulació de les dinàmiques del citoesquelet (**figura I.2.4**).



**Figura I.2.4.** Esquema representatiu de les vies de senyalització i mecanismes involucrats en la polarització neuronal. Adaptat de (Takano et al., 2015).

### 2.2.2.1 Senyalització lipídica

Hi ha una distribució asimètrica de proteïnes a la membrana que genera subdominis. Aquesta distribució asimètrica de lípids és molt important, ja que són molècules diana de senyalització lipídica. En aquest sentit, la senyalització lipídica està involucrada en la polaritat neuronal (Barnes and Polleux, 2009; Tahirovic and Bradke, 2009):

- **Sialidasa de la membrana plasmàtica dels gangliòsids (plasma membrane ganglioside sialidase, PMGS)**. Aquesta proteïna es troba enriquida en la neurita que esdevindrà axó, i la seva activitat ajuda a posicionar els receptors i proteïnes involucrades en la guia axonal. És el cas, per exemple, del receptor cinasa relacionat amb tropomiosina A (tropomyosin-related kinase receptor A, TrkA) que actua de receptor del factor de creixement del nervi (nerve growth factor, NGF).
- **Cinasa PI<sub>3</sub> (PI3K)**. Una proteïna molt important per la polaritat i la senyalització lipídica és el fosfatidilinositol-3-fosfat (phosphatidylinositol-3-phosphate, PIP<sub>3</sub>), que es sintetitza a través de la cinasa PI3K. La cinasa PI3K, controla diferents proteïnes que regulen les dinàmiques del citoesquelet tant d'actina com de microtúbuls a través de PIP<sub>3</sub>. En concret, PI3K es troba localitzada en l'extrem dels cons de creixement en l'estadi 3 de Banker, i la seva activitat és clau per la formació d'axons.
- **Fosfatasa i Tensina homòloga delecionada en el cromosoma 10 (phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN)**. PTEN és la fosfatasa amb l'activitat oposada a cinasa PI3K, per tant desfosforila PIP<sub>3</sub> a PIP<sub>2</sub>. D'aquesta manera, PTEN realitza un control espacial i temporal de la senyal induïda per PIP<sub>3</sub> i contribueix en la regulació del nombre d'axons.

Durant el procés de polarització neuronal, l'equilibri de la composició de fosfolípids de membrana està altament regulat per mantenir un equilibri i donar lloc a un únic axó. En aquest sentit, les rutes activades per PI3K i PTEN són crucials.

### 2.2.2.2 Akt/GSK3 $\beta$

La cinasa de la sintasa de glicogen 3 $\beta$  (glycogen synthase Kinase-3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ ) és una cinasa constitutivament activa. La seva activitat està controlada per l'acció de diferents cinases, com per exemple Akt o la proteïna cinasa atípica C (atypical protein kinase C, aPKC). La fosforilació en la Serina 9 produeix la seva inactivació.

Per altra banda, moltes proteïnes són reclutades pel domini homòleg de pleckstrina (Pleckstrin Homology domain, PH) de PIP<sub>3</sub>. Una proteïna que s'activa quan s'uneix a PIP<sub>3</sub> és Akt. D'aquesta manera, Akt regula la formació de l'axó a través de la cinasa GSK3 $\beta$ . Així doncs, GSK3 $\beta$  és un efector de la via de senyalització de la PI3K. L'activació de Akt produeix la fosforilació de GSK3 $\beta$ , inactivant-lo. En conjunt, GSK3 $\beta$  controla la formació d'axons, la seva acció en les altres neurites inhibeix l'aparició de múltiples axons. En aquest sentit, la funció de GSK3 $\beta$  es produeix a través de la fosforilació de proteïnes estabilitzadores de microtúbuls com, per exemple, Map1b, Tau, APC o CRMP-2, que modifiquen les dinàmiques del citoesquelet en ser fosforilades per GSK3 $\beta$ .

Resumint, PI3K es troba enriquida en la neurita que forma l'axó, on es produeix l'activació d'Akt, que alhora inhibeix l'activitat de GSK3 $\beta$ . Com a conseqüència, es produeix una estabilització dels microtúbuls i un creixement axonal, ja que APC i CRMP-2 presenten un menor grau de fosforilació que en les altres neurites (Barnes and Polleux, 2009).

### 2.2.2.3 PAR

La família de proteïnes del complex deficient de particions (partitioning defective complex, PAR complex) són essencials en la polarització de molts tipus cel·lulars, també en les neurones (Tahirovic and Bradke, 2009; Takano et al., 2015). Aquesta família de proteïnes formen diferents complexos, que es poden dividir en dos grups:

- **LKB1 (PAR4) i les cinases deficientes de sinapsis a amfibis A i B (synapses of amphids defective Kinasa, SAD-A/B Kinasa).** LKB1 és activat a través de la proteïna cinasa depenent de AMP-cíclic (cAMP-depenent protein kinase, PKA). LKB1 regula les cinases SAD-A/B i les cinases reguladores de l'afinitat a microtúbuls 1-4 (microtubule affinity-regulated kinases, MARK1-4). L'acció de les cinases SAD i MARK recau en la regulació de diferents proteïnes MAPs, com Map2/4, Tau i DCX. En aquest sentit, la fosforilació d'aquestes MAPs facilita la polimerització dels microtúbuls. En concret, aquest procés afavoreix el creixement neurític i és necessari per la formació i especificació de l'axó.
- **PAR3, PAR6 i aPKC.** El complex format per PAR3/PAR6 interacciona amb moltes proteïnes involucrades en la polaritat neuronal, com aPKC, PTEN, Cdc42, Tiam1 o proteïna motora cinesina KIF3A. L'activitat de aPKC, conjuntament amb el complex PAR3/6, són rellevants en la polaritat neuronal. Actuen a través de diferents mecanismes relacionats, per exemple, amb la regulació del citoesquelet o del transport. Cal destacar que la seva activitat es troba restringida a la neurita que dona lloc a l'axó. En aquest sentit, la seva localització depèn de la interacció amb KIF3A. Per altra banda, l'activitat del complex es regula a través de l'acció de PI3K.

### 2.2.2.4 CaMKK/CaMKI

El calci és un segon missatger present en molts processos biològics. A nivell neuronal és molt important per molts mecanismes: remodelació sinàptica, apoptosi i polarització neuronal.

En la polarització neuronal, l'acció de  $IP_3$  produeix un increment de calci local. Aquest augment produeix una activació local de la via de la proteïna cinasa depenent de Calci-calmodulina 1 ( $Ca^{+2}$ /calmodulin-dependent protein kinase I, CaMKI) i la cinasa de la proteïna cinasa depenent de Calci-calmodulina ( $Ca^{+2}$ /calmodulin-dependent protein kinase kinase, CaMKK). L'activació de CaMKI per CaMKK provoca l'activació de MARK2. En general, l'activació de les diferents proteïnes MARKs produeixen una fosforilació de les MAPs, que promouen el creixement neurític. Així doncs, aquesta via s'ha vist involucrada en el creixement axonal i la polaritat (Funahashi et al., 2014).

### 2.2.2.5 Ras-GTPases i Rho-GTPases, famílies de les petites GTPases

Les petites guanosina-trifosfatases (small GTPases) són reguladores essencials del citoesquelet i de les dinàmiques associades a membranes. La seva localització pròxima a la membrana és fonamental per les funcions que desenvolupen. En aquest sentit, participen en la polaritat, mobilitat i creixement cel·lular. Són proteïnes actives quan estan unides a guanosina trifosfat (guanosine triphosphate, GTP) i inactives quan s'hidrolitza el GTP a guanosina difosfat (guanosine diphosphate, GDP). Aquesta activitat catalítica està controlada per proteïnes activadores de GTPases (GTPase-activating proteins, GAP). Per tant, si fomenten el canvi de GTP a GDP, les GAP són proteïnes reguladores negatives de les GTPases. Altres proteïnes inactivadores són les proteïnes inhibidores de dissociació de nucleòtids de guanosina (guanine nucleotide-dissociation inhibitors, GDIs), que eviten el canvi de GDP a GTP. Trobem altres

proteïnes involucrades en la regulació d'activitat d'aquestes proteïnes. Així doncs, els reguladors positius són els factors intercanviadors de nucleòtids de guanosina (guanine nucleotide exchange factors, GEFs). Cal remarcar que la importància de les GTPases és reflecteix en l'elevat nombre de proteïnes reguladores que hi ha al genoma; en cas del humà són 53 GAPs i 69 GEFs (Arimura and Kaibuchi, 2007; Barnes and Polleux, 2009).

- **Família Ras:** diferents proteïnes d'aquesta família, com H-Ras, R-Ras, N-Ras o Rap, estan involucrades en la polaritat neuronal. Ras activa PI3K i participa conjuntament amb altres vies com la de LKB1 en crear el bucle positiu que afavoreix la determinació de la neurita que donarà lloc a l'axó.
- **Família de les Rho-GTPases:** Cdc42, Rho-A, Rac i la família de Rnd són els membres més importants d'aquesta família involucrats en la polaritat neuronal. Cdc42 regula dinàmiques d'actina a través de WASP i de la cinasa activada-P21 (p21-activated kinase, PAK). En concret, PAK regula cofilina. En aquest sentit, WASP i cofilina són essencials per la formació d'estructures d'actina dels fil·lopodis en el con de creixement. Cal recordar que Cdc42 interacciona amb el complex PAR3/PAR6 en la neurita que esdevindrà axó. A més a més, Cdc42 és activat per PI3K.

Rac1 també modula les dinàmiques del citoesquelet d'actina, però en la formació dels lamel·lipodis. La seva acció es produeix a través de PAK i WAVE. A més a més, Rac1 també regula dinàmiques de microtúbuls a través de la inhibició de Stathmin/Op18. D'aquesta manera, Rac1 és un regulador positiu del creixement axonal. El complex PAR activa Rac1 a través de la proteïna de la cèl·lula T limfoma de invasió i metàstasi (T-cell lymphoma and metàstasi 1, Tiam1). Tiam1 es una proteïna GEF.

Rho-A és una fosfatasa associada en la desestabilització del citoesquelet d'actina necessària per la neuritogènesi. Un dels efectors de Rho-A és la cinasa de Rho (ROCK) que regula les dinàmiques d'actina i l'estabilitat dels microtúbuls.

D'aquesta manera, la família de les Rho-GTPases controla diferents aspectes del citoesquelet d'actina. Com hem vist, Rho-A té un efecte oposat a Rac1 i Cdc42: Rac1 i Cdc42 activen el complex Arp2/3 que promou la polimerització i ramificació de les estructures d'actina.

Per altra banda, el paper de les proteïnes reguladores és essencial en la polarització. Les proteïnes GAPs, com la proteïna p190RhoGAP, i GEFs, com Tiam1 i DOCK, regulen la formació d'axons.

La localització subcel·lular i l'activació de les petites GTPases són rellevants degut a l'elevat nombre dels seus efectors que regulen les dinàmiques del citoesquelet. La regulació temporal i espacial d'aquests GTPases és clau pel procés de polarització, funció que realitzen les GAPs, GEFs i GDIs (Barnes and Polleux, 2009; Tahirovic and Bradke, 2009; Takano et al., 2015).



El citoesquelet és el component clau durant la polarització neuronal, però trobem altres mecanismes involucrats en la morfogènesi neuronal. La majoria d'ells tenen relació amb el citoesquelet, de forma directa o indirecta. Canvis en aquests mecanismes afecten a les dinàmiques del citoesquelet, i viceversa.

### **2.2.3 Tràfic vesicular i molècules de transport**

Durant el procés de polarització és necessari l'aportació de membranes, orgànuls i vesícules al con de creixement. A l'inici de la polarització es produeix un desequilibri que afavoreix el flux de proteïnes del soma a una neurita. Aquest fet facilita la diferenciació d'aquesta neurita a axó. En concret, el flux es produeix a través de proteïnes motores associades al citoesquelet de microtúbuls, cinesines i dineïnes, i al citoesquelet d'actina, miosines. D'aquesta manera, el transport és clau en el procés de polarització i el seu manteniment.

Les molècules encarregades del transport i del tràfic vesicular són importants per la formació i manteniment de la polaritat neuronal. Les principals molècules encarregades d'aquestes funcions i involucrades en el procés de polarització són les cinesines GAKIN i KIF3A. GAKIN és una proteïna amb similitud a les cinesines i està involucrada amb la localització de PIP<sub>3</sub>. Per altra banda, KIF3A ajuda a la localització al proto-axó del complex PAR.

Per altra banda, les dineïnes participen en el posicionament del centrosoma i el transport vesicular. En aquest sentit, les dineïnes interaccionen amb la proteïna Lis, proteïna associada als microtúbuls i que participa en el desplaçament del centrosoma.

Altres proteïnes rellevants en el tràfic vesicular, com Rab8 o TI-VAMP, també són importants per a la polarització neuronal.

Per altra banda, l'aparell de Golgi és l'orgànul amb major aportació de vesícules. La posició de l'aparell de Golgi és essencial pel procés d'especificació d'una neurita a dendrita apical. Durant aquest procés es produeix una elevada incorporació de vesícules que provenen de l'aparell de Golgi. En aquest procés de tràfic vesicular s'han identificat gens que influeixen en la polaritat, com LRK1 i SAD.

D'aquesta manera, el transport de proteïnes, de vesícules i orgànuls, conjuntament amb les molècules que realitzen aquest transport, són essencials per la polarització. A més a més, aquest mecanisme és clau pel manteniment de la polaritat neuronal. Les neurones són cèl·lules compartimentalitzades amb unes distàncies molt grans amb un transport específic per a cada compartiment. En aquest sentit, per mantenir la seva composició i les seves propietats és necessari un òptim transport proteic. Aquest mecanisme es detallà en l'apartat de "Manteniment de la polaritat neuronal" (Barnes and Polleux, 2009; Namba et al., 2015).

### **2.2.4 Degradació proteica local**

Durant la polarització es produeixen canvis en els nivells proteics al llarg de la neurona. D'aquesta manera, tenim dominis més rics en determinades proteïnes, que són essencials pel procés de polarització. Aquests nivells proteics es regulen a través de l'aportació específica i de la degradació específica de determinades proteïnes en un domini subcel·lular. Aquests mecanismes de degradació són rellevants en diferents processos neuronals com, per exemple, la guia axonal, remodelació de les sinapsis i formació de les neurites.

Alguns exemples en la polarització neuronal són l'acumulació de Akt i Rap1b i la reducció de la cinasa LIM (LIMK). L'acumulació de Akt i Rap1b tenen mecanismes semblants i són essencials en la neurita que donarà lloc a l'axó, aquesta acumulació s'aconsegueix degut a degradació

específica de Akt i Rap1b en les altres neurites. El cas de LIMK és el contrari, els seus nivells s'han de reduir en la neurita que esdevindrà axó (Barnes and Polleux, 2009).

### **2.2.5 Centrosoma**

El centrosoma és el principal centre organitzador de microtúbuls (microtubule-organizing center, MTOC) en les cèl·lules eucariotes. Facilita la polimerització i la incorporació de nous microtúbuls als diferents compartiments. Així doncs, la posició del centrosoma en el procés de polarització és una conseqüència i no una causa de la polarització neuronal. En concret, la posició del centrosoma estaria regulada per proteïnes involucrades en la polaritat com el complex PAR, concretament per aPKC (Barnes and Polleux, 2009; Namba et al., 2015). D'aquesta manera, el centrosoma es posiciona a l'extrem de l'axó per facilitar la incorporació de microtúbuls que permeten l'elongació de l'axó.

Posteriorment, té lloc l'aparició de diferents MTOCs independents del centrosoma, que tindran una funció rellevant en el desenvolupament de l'arbre dendrític i axonal, i en el manteniment de la polarització.

### **2.2.6 Barrera bioquímica**

Els dos compartiments, axonal i dendrític, estan separats per una barrera, tant en el citoplasma com en la membrana. Aquesta barrera és essencial per mantenir les característiques dels dos compartiments al llarg del temps (Lewis et al., 2013; Namba et al., 2015). Aquest apartat es detalla de forma més extensa a l'apartat "Manteniment de la polarització neuronal"

## 2.3 Funcionament del con de creixement

Una estructura clau per la neurona en la polarització neuronal és el con de creixement (**figura I.2.5**). El con de creixement està present als extrems de les neurites i permet l'exploració del ambient, la internalització de les senyals i la integració d'aquestes senyals modificant el citoesquelet. El més conegut és el con de creixement del axó. Tanmateix, les dendrites també presenten un con de creixement.

A nivell d'estructura, a la part central del con trobem orgànuls i microtúbuls i a la part externa hi ha regions riques amb actina formant lamel·lipodis i fil·lopodis. Aquestes estructures d'actina són molt dinàmiques. Per mantenir la dinàmica dels cons de creixement es produeix una constant incorporació de F-actin als extrems de les fibres. Aquest dinamisme es regula a través de les proteïnes associades a actina que promouen la formació d'aquestes estructures com, per exemple, ENA/VASP, ARP2/3 o Cofilin (Dent et al., 2011; Takano et al., 2015).

Durant la morfogènesi neuronal, les neurones s'adapten a les senyals externes a través dels cons de creixement. En concret, els cons de creixement modifiquen el citoesquelet a través de la internalització d'aquestes senyals (**figura I.2.5**). D'aquesta manera, si l'estímul és atractiu es produeix una estabilització de les estructures formades i una elongació de la prolongació en una direcció concreta. Pel contrari, si l'estímul és repel·lent es produeix una modificació del citoesquelet provocant la retracció de les estructures.

En el cas de la retracció es produeix un procés de despolimerització de les fibres d'actina i s'incrementen els fenòmens de catàstrofe dels microtúbuls. També té lloc un increment de l'endocitosi per internalitzar la membrana.

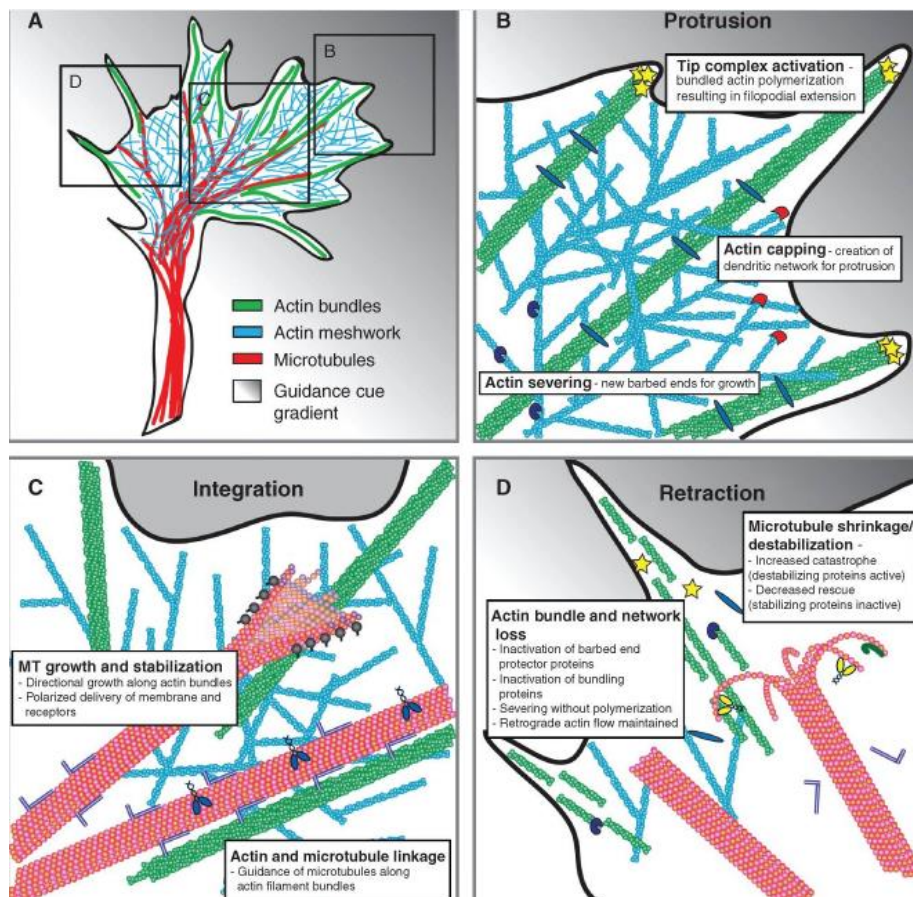
En el cas de senyals positives, els cons de creixement s'estabilitzen i empenyen la membrana. Paral·lelament al dinamisme del citoesquelet d'actina, existeix un dinamisme en el citoesquelet de microtúbuls. En aquest sentit, l'estabilització del con de creixement es produeix a través de la penetració del citoesquelet de microtúbuls a l'interior de les estructures riques amb actina. La consolidació del citoesquelet de microtúbuls permet el transport de vesícules a través de les proteïnes motores. D'aquesta manera, aquests mecanismes faciliten la incorporació de membrana en les zones d'expansió.

Així doncs, la interacció entre el citoesquelet d'actina i el citoesquelet de microtúbuls és necessària, per tal de permetre l'exploració i l'elongació o la retracció del con. Les proteïnes involucrades en aquesta interacció són:

- **Els membres de la família de les Rho GTPases:** aquestes proteïnes i les diferents proteïnes associades que regulen la seva activitat, com cinases, GEFs o GAPs, controlen dinàmiques dels dos citoesquelets.
- **Proteïnes motores:** les dineïnes i les miosines, presents al citoesquelet de microtúbuls i d'actina, respectivament. Aquestes proteïnes facilitarien la interacció dels diferents estructures.
- **MAPs:** en concret, Map1B i Map2. Aquestes proteïnes són essencials per l'estabilització del citoesquelet de microtúbuls. A més a més, s'uneixen al citoesquelet d'actina. Aquesta unió permet la consolidació del citoesquelet de microtúbuls als dominis rics d'actina. (Mohan and John, 2015).

Per altra banda, els microtúbuls també interaccionen de forma directa o indirecta amb estructures ancorades a la membrana que regulen dinàmiques del citoesquelet com, per exemple, amb proteïnes d'adhesió a través de les dineïnes (Perlson et al., 2013).

Per tant, la dinàmica del con de creixement és molt complexa i està regulada per diverses vies, proteïnes i mecanismes. A més a més, defectes en aquest dinamisme produeixen errors en la mobilitat del con de creixement que provoquen greus defectes de polarització, desenvolupament neurític i connexió neuronal.



**Figura 1.2.5.** Esquema representatiu de la dinàmica del con de creixement en front un estímul extern.

A) A la part central del con trobem orgànuls i microtúbuls. A la part externa trobem regions riques amb actina formant lamel·lipodis i fil·lopodis. El con de creixement respon als estímuls, atractius o repel·lents, modificant la dinàmica dels citoesquelets d'actina i microtúbuls, B,C i D. En el cas d'estímuls atractius, B i C, es produeix la internalització i l'estabilització del citoesquelet de microtúbuls a l'interior de les estructures riques amb actina. En cas d'estímuls repel·lents, D, hi ha un procés de despolimerització de les fibres d'actina i s'incrementen els fenòmens de catàstrofe dels microtúbuls. Adaptat de (Dent et al., 2011).

## 2.4 Bucles positiu i negatiu

En el procés d'especificació d'una neurita a axó intervenen diferents mecanismes. S'ha hipotetitzat un possible mecanisme a través del qual una de les neurites esdevé axó i involucra diferents vies de senyalització (**figura 1.2.4 "positive feedback"**). Així doncs, en una de les neurites té lloc un bucle positiu i es basa en una activació en bucle de les proteïnes: PI3K-Cdc42-complexPAR-Rac1-PI3K. El bucle és produït en una neurita concreta degut a factors intracel·lulars i extracel·lulars. Aquests factors promouen senyals que inicien el bucle, produint una retroalimentació que facilita la polarització neuronal.

Per altra banda, en les altres neurites que no donen lloc a l'axó, es produeix un bucle negatiu que facilita diferents processos: la internalització de les membranes, fenòmens de degradació de proteïna, la desestabilització del citoesquelet de microtúbuls i la pèrdua de les dinàmiques d'actina (Cheng and Poo, 2012; Namba et al., 2015; Takano et al., 2015).

## 2.5 Mecanismes *in vivo* de la polarització neuronal

La polarització *in vivo* està regulada a nivell temporal i espacial. Trobem moltes molècules extracel·lulars que presenten patrons d'expressió variables durant les diferents etapes del desenvolupament. En general, la majoria de molècules extracel·lulars modulen les mateixes vies de senyalització que determinen la polarització *in vitro*.

S'ha corroborat que la majoria de molècules implicades en la polarització *in vitro* també afecten la polarització *in vivo*, però trobem exemples que posen de manifest que *in vivo* hi ha sistemes de compensació i de redundància que rescaten fenotips molt severs observats *in vitro*, com pot ser el cas de GSK3 $\beta$ . En concret, el ratolí deficient GSK3 $\beta$  és totalment normal i les neurones tenen un procés de polarització correcte degut a l'acció compensatòria de GSK3 $\alpha$  (Funahashi et al., 2014; Takano et al., 2015).

Per altra banda, l'estudi d'animals transgènics i tècniques com l'electroporació *in utero* han permès estudiar l'efecte en la polarització *in vivo*. Una part dels efectes observats en la polarització *in vivo* estan associats al procés de transició de multipolar (MP) a bipolar (BP). Durant aquesta transició defineix el TP que donarà lloc a l'axó. Per aquest motiu es troba afectada quan tenim alterat el procés de polarització. L'altra part dels efectes s'observen a la direccionalitat i/o el creixement axonal.

### 2.5.1 Senyals extracel·lulars

Existeixen diferents classes de senyals extracel·lulars que afecten la polarització neuronal: (Namba et al., 2015; Takano et al., 2015):

- **Neurotrofines (factor neurotròfic derivat de cervell (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) i neurotrofina 3 (neurotrophin 3)):** aquestes molècules actuen sobre els receptors TrkB i TrkC. Es tracta de receptors que activen la via de PI3K i promouen la formació i elongació de l'axó.  
BDNF i NGF també s'uneixen al receptor TrkA, que activa PKA, modulador de LKB1. A més a més, la localització del receptor de TrkA depèn de la interacció amb PMGS.  
Les neurotrofines també activen la via de les CaMKK, involucrada en la migració i la transició de MP a BP a través de MARK2 i la seva acció sobre les MAPs estabilitzadores.
- **TGF $\beta$  superfamília (TGF $\beta$  i BMP):** Els receptors de TGF $\beta$  modulen l'activitat de la família de les Rho GTPases. Aquesta regulació té lloc localment. Així doncs, la pèrdua de receptors TGF $\beta$  produeix problemes en la especificació del TP i la conseqüent formació del axó. A més a més, aquesta pèrdua afecta la migració neuronal. Per altra banda, la BMP regula la transcripció de CRMP-2, essencial per l'estabilitat dels microtúbuls.
- **Reelina:** aquesta proteïna està involucrada en la transició MP a BP a través de Rap1. En concret, Rap1 controla la quantitat de N-caderina, clau en aquesta transició. Reelina també podria participar en la formació del terminal axonal.
- **Molècules d'adhesió cel·lular:** trobem moltes molècules d'adhesió que participen en la polarització neuronal. Les més rellevants són la N-caderina i Contactin-2. S'ha vist que N-caderina controla la transició de MP a BP i la migració neuronal dependent de glia radial. Per altra banda, Contactin-2 (coneguda també com a TAG-1) participa en la transició de MP a BP a través de Rac1.

### 2.5.2 Regulació transcripcional

S'han identificat diferents factors de transcripció i factors epigenètics que regulen la polarització neuronal *in vivo*. Com hem vist, l'expressió de diferents factors de transcripció al llarg del desenvolupament originen la regionalització i els diferents tipus neuronals. Al mateix temps, els factors de transcripció també estan involucrats en la transició de MP a BP i la migració neuronal (de la Torre-Ubieta and Bonni, 2011; Namba et al., 2015).

Un dels exemples és Neurogenin-2, que regula la transcripció de Rho-A i Rnd2 negativament i positivament, respectivament. Aquestes dues GTPases estan involucrades en la transició de MP a BP i la migració. Així doncs, canvis en Neurogenin-2 que ocasionen la pèrdua de RhoA inhibeixen la migració radial. Aquests canvis també poden causar la pèrdua de Rnd que produeix un retard temporal en la transició de MP a BP (Takano et al., 2015).

Per altra banda, trobem la família de factors de transcripció FoXO que regulen la transcripció de proteïnes involucrades en la polarització neuronal, tals com Pak1 i Dab1. En concret, Dab1 és clau en l'activació de la senyal induïda per Reelina (de la Torre-Ubieta and Bonni, 2011; Namba et al., 2015).

A nivell *in vivo*, l'epigenètica també regula la polarització neuronal. Dicer és l'enzim clau en la formació de miRNAs. En aquest sentit, l'animal deficient en Dicer presenta alteracions en la formació del còrtex i en l'axogènesi, com a conseqüència de la falta de molts miRNAs que controlen l'expressió de proteïnes involucrades en la polarització neuronal. Aquest és el cas de l'expressió de aPKC o DCX (Namba et al., 2015)

## 2.6 Manteniment de la polaritat neuronal

La polaritat neuronal es manté al llarg del temps i és essencial pel correcte funcionament de la neurona. Hi ha moltes proteïnes involucrades en funcions bàsiques de la neurona a nivell del citoesquelet, transport i neurotransmissió que estan segregades en un únic compartiment. La pèrdua de la polaritat neuronal s'ha vist associada a problemes de processament de la informació i aprenentatge, i està involucrada en malalties neurodegeneratives. El manteniment de la composició diferencial dels compartiments és degut a un transport diferenciat en axó i dendrites. La selecció del transport es produeix a través d'una barrera física existent al fragment inicial de l'axó (axonal initial segment, AIS) (**figura 1.2.6**) (Bentley and Banker, 2016; Lewis et al., 2013; Namba et al., 2015; Rasband, 2010).

### 2.6.1 Fragment inicial de l'axó (AIS)

Durant la polarització neuronal es forma una barrera de difusió. Aquesta barrera es produeix a través d'una acumulació de filaments d'actina a l'axó, concretament al segment pròxim al soma. Posteriorment aquests filaments d'actina generen l'acumulació d'Ankirina G a l'AIS.

La membrana de l'AIS té una composició característica tant a nivell lipídic, degut a modificacions postraduccionals, com a nivell proteic. En concret, l'Ankirina G produeix l'acumulació de proteïnes de membrana específiques de l'AIS, cosa que provoca una elevada densitat proteica, donant lloc a una barrera a la membrana. D'aquesta manera, les proteïnes axonals es troben restringides al seu compartiment degut a que aquesta barrera física evita la difusió. A nivell molecular, en aquesta fragment de membrana trobem proteïnes d'adhesió com la molècula d'adhesió cel·lular neuronal (neuronal cell adhesion molecule, NrCAM) i la glicoproteïna axonal transitòria (transient axonal glycoprotein 1, TAG1), i canals iònics, com Nav1 i KCNQ2-KCNQ3.

A nivell citoplasmàtic, els filaments d'actina interaccionen amb la membrana a través de l'espectina  $\beta$ IV. A més a més, els filaments d'actina i el citoesquelet de microtúbuls creen una barrera a través de la qual es regula el tràfic neuronal entre els compartiments somato-dendrític i axonal.

Així doncs, l'AIS és clau pel manteniment de la polaritat. Canvis en l'AIS afecten la polaritat neuronal i la funcionalitat de la neurona, com ara modificacions en el tràfic vesicular o la desorganització dels canals iònics, claus en la generació dels potencials d'acció (Bentley and Banker, 2016; Rasband, 2010).

### 2.6.2 Organització i composició

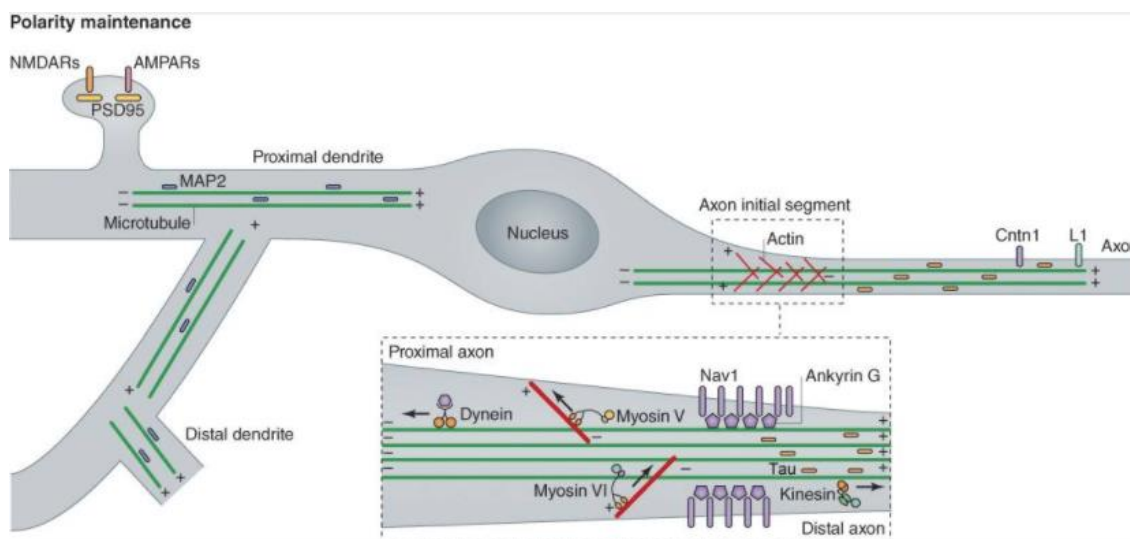
El compartiment dendrític i axonal contenen cadascú un citoesquelet característic diferenciat. En el cas del citoesquelet de microtúbuls, aquest presenta una orientació diferent en cada compartiment. A l'axó, els microtúbuls estan orientats amb l'extrem negatiu al soma i el positiu a l'axó. A les dendrites, en canvi, trobem una barreja en l'orientació dels microtúbuls. Aquesta organització es defineix durant la polarització neuronal i es manté al llarg del temps.

A nivell experimental es pot observar l'orientació del citoesquelet de microtúbuls amb la proteïna de fusió EB3-GFP. EB3 és una proteïna que s'uneix al extrem positiu dels microtúbuls. D'aquesta manera, la proteïna de fusió s'acumula quan es produeix la polimerització dels microtúbuls, donant lloc als cometes (s'observa un feix de fluorescència que recorre l'axó o la dendrita i desapareix). Els cometes permeten realitzar estudis de polimerització dels microtúbuls *in vitro* i *in vivo* (Stepanova et al., 2003; Yau et al., 2016).

En els primers estadis de diferenciació neuronal, el principal MTOC és el centrosoma. En neurones madures, en canvi, la majoria de microtúbuls estan associats a MTOCs independents del centrosoma. En aquest sentit, aquesta font de microtúbuls s'origina per: l'acció de proteïnes de tall que separen els microtúbuls del centrosoma, captura per part de MTOCs independents del centrosoma o interacció amb proteïnes transportadores. Les proteïnes transportadores interaccionen amb l'extrem negatiu dels microtúbuls i permeten la polimerització a l'extrem positiu. Si en fixem en les dendrites, trobem que estan enriquides amb microtúbuls capturats per l'aparell de Golgi de lloc d'avançada (Golgi outposts, GoOP). Aquest aparell de Golgi és característic del compartiment dendrític, no es troba connectat al citoplasma i actua de MTOC. En axons, els microtúbuls estan organitzats degut a l'acció de les proteïnes transportadores i les estabilitzadores de l'extrem negatiu. En aquest procés són importants els mecanismes de transport i alineament de les fibres per a la correcta orientació.

Per altra banda, l'estabilitat del citoesquelet de microtúbuls també és diferent entre compartiments: l'axonal és més estable que el dendrític. Part d'aquesta estabilitat és deu a les modificacions postraduccionals. Així doncs, les dendrites tenen una major quantitat de tubulina tirosinada, i l'axó una major quantitat de tubulina acetilada. En concret, la tubulina acetilada és clau en el compartiment axonal per tal de mantenir la polaritat, ja que canvis en l'acetilació modifiquen l' AIS.

Una altra diferència a nivell d'estabilitat i composició és la presència de determinades MAPs a cada compartiment. L'axó es ric en Map1B i Tau, les dendrites són riques en Map2 (Namba et al., 2015).



**Figura 1.2.6. Mecanismes involucrats en el manteniment de la polaritat neuronal.**

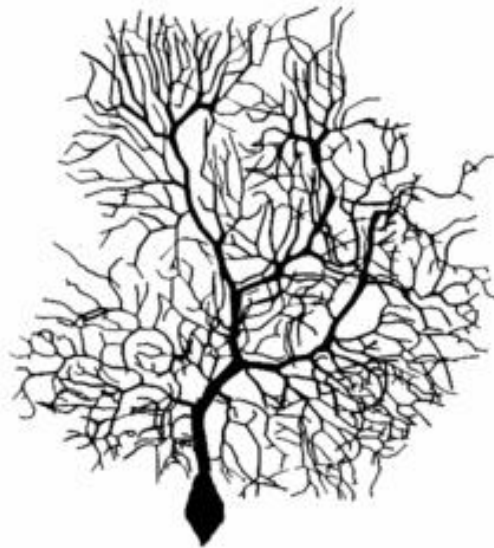
S'ha descrit tres mecanismes involucrats en el manteniment de la polaritat, el fragment inicial de l'axó (AIS): la composició del citoesquelet, la seva organització i el transport. L'element clau en aquest manteniment és el fragment inicial de l'axó. La composició diferencial entre axó i dendrites s'origina degut a un transport característic de cada compartiment. Adaptat de (Lewis et al., 2013)



### **2.6.3 Tràfic vesicular**

El tràfic neuronal està regulat per l'AIS, les proteïnes motores, els adaptadors de cargo i els mecanismes d'alliberament. Les kinesines poden transportar cargos tant a la zona dendrítica com axonal. Les dineïnes es troben restringides en el transport somato-dendrític o el transport retrògrad axonal. Trobem determinades kinesines que tenen una preferència pel compartiment axonal, com pot ser KIF4 o KIF5. Es produeix una selecció específica en l'AIS. En aquesta selecció participen les proteïnes associades als filaments d'actina i al citoesquelet de microtúbuls. Així doncs, aquest sistema permet l'enriquiment dels diferents compartiments amb proteïnes específiques. D'aquesta manera, les proteïnes involucrades en la transmissió postsinàptica es troben enriquides en el compartiment dendrític, i les proteïnes involucrades en la guia axonal en el compartiment axonal (Lewis et al., 2013; Namba et al., 2015).

### 3. Formació de l'arbre dendrític i axonal



La polarització neuronal defineix uns compartiments que han de madurar i diferenciar-se per permetre la connexió entre neurones. Es produeixen diversos canvis morfològics en els quals participen molts mecanismes per donar lloc a les dendrites i els terminals axonals madurs.

Després de la polarització neuronal, es produeix un creixement neurític que permet la formació i ramificació de l'arbre dendrític i axonal, estadis 4 i 5 Branke. Aquest procés de ramificació és molt important *in vivo*, ja que la correcta ramificació d'axons i dendrites permet la formació de les estructures que formaran els circuits necessaris pel correcte funcionament del cervell. L'avantatge és que aquests processos també es produeixen en cultius neuronals *in vitro*, facilitant l'estudi dels mecanismes involucrats (Urbanska et al., 2008; Valnegri et al., 2015).

La formació i desenvolupament de l'arbre dendrític i el terminal axonal es basen en tres principis (Jan and Jan, 2010):

1. La neurona necessita cobrir una determinada àrea amb les seves dendrites i axó, on rebrà i projectarà les senyals externes.
2. La ramificació de l'arbre dendrític i del terminal axonal segueixen un patró d'integració, processament i projecció de les senyals.
3. Les dendrites i axons permeten una modificació de les estructures durant el procés de refinament i adaptació a les senyals externes al llarg del desenvolupament i aprenentatge.

En els processos de maduració de la neurona i desenvolupament de l'arbre dendrític i el terminal axonal trobem diferents mecanismes involucrats: la transcripció proteica, els de recanvi de membranes, l'expressió gènica i les dinàmiques del citoesquelet (Jan and Jan, 2010).

### **3.1 Desenvolupament de l'arbre dendrític**

La morfogènesi i ramificació de l'arbre dendrític determinaran la forma i l'organització de la neurona. Aquests processos són claus perquè determinaran la integració i processament de les senyals externes. S'han descrit errors en la formació de l'arbre dendrític en moltes malalties com, per exemple, el síndrome de Down, el síndrome de X fràgil o patologies neurodegeneratives (Kaufmann et al., 2000; Kaufmann and Moser, 2000).

Els mecanismes involucrats en la formació de l'arbre dendrític es poden agrupar en 4 apartats que veurem a continuació (Jan and Jan, 2010; Urbanska et al., 2008).

#### **3.1.1 Citoesquelet en la formació de l'arbre dendrític**

El citoesquelet juga un paper fonamental en la formació de l'arbre dendrític i la ramificació axonal. Com passa en l'estadi de polarització neuronal, durant la formació de l'arbre dendrític i axonal, el citoesquelet també rep la influència de diferents processos. En aquest sentit, les dendrites i l'axó presenten un con de creixement al seu extrem, que permet el creixement i l'exploració de l'exterior. D'aquesta manera, les senyals externes modulen el citoesquelet, facilitant el procés d'elongació i ramificació de les dendrites i de l'axó. Tan a nivell *in vitro* com *in vivo*, estan involucrades les mateixes vies de senyalització que hem vist al capítol de "Polarització neuronal" (Conde and Caceres, 2009).

Així doncs, el citoesquelet d'actina és clau en els cons de creixements de les dendrites. D'aquesta manera, s'ha vist que les proteïnes associades a la regulació del citoesquelet d'actina en els cons de creixement, com les petites GTPases de la família Rho o les cinasa ROCK, són claus en la formació de l'arbre dendrític.

A nivell de citoesquelet de microtúbuls és molt important el manteniment i l'orientació del citoesquelet, totalment diferent al de l'axó. Proteïnes de transport, com CHO1, i MAPs, (com per exemple Map1A i Map2) es troben segregades al compartiment dendrític i són essencials

per mantenir l'orientació dels microtúbuls i promoure la formació de l'arbre dendrític. S'ha demostrat que la modulació dels seus nivells afecten la diferenciació i formació de l'arbre dendrític. En concret, el dèficit de Map2 durant el procés de morfogènesi dendrítica evita la formació de l'arbre dendrític.

A més a més, l'afinitat de les MAPs als microtúbuls es regula per fosforilació. En aquest sentit, la regulació de les cinases que afecten a les MAPs, com les diferents MAPKs, també són essencials en aquesta formació del l'arbre dendrític (Conde and Caceres, 2009; Namba et al., 2015).

### **3.1.1.1 Família de les petites GTPases**

La família de les petites GTPases estan involucrades en diferents aspectes en la formació i ramificació de les dendrites. Podem diferenciar la família de Rho, involucrada en dinàmiques d'actina, i la família de Ras, implicada en l'activació de diverses vies de senyalització claus per la formació de l'arbre dendrític (Van Aelst and Cline, 2004). S'ha demostrat que proteïnes de la família de Ras formen part de complexos proteics involucrats en el control de morfogènesi i complexitat de l'arbre dendrític. D'aquesta família de proteïnes cal destacar la Ras, Rap i Rit. Totes les proteïnes que regulen l'activitat d'aquestes petites GTPases, com GEFs, GDIs o GAPs, també són importants per el creixement dendrític. L'efecte d'aquestes proteïnes Ras es deu a la seva relació amb l'acció de diferents cinases com PI3K, CaMKI o la cinasa diana de rapamicina en mamífers (mammalian target of rapamycin, mTOR)(Urbanska et al., 2008; Van Aelst and Cline, 2004).

### **3.1.1.2 Cinases**

Trobem moltes cinases involucrades en la formació de l'arbre dendrític, com GSK3 $\beta$ , PKA, MAPK, mTOR, CaMK, PI3K o JNK1 (Urbanska et al., 2008).

La família de les CaMKs conté diferents cinases involucrades en el creixement dendrític. Aquestes cinases són dependents d'activitat; s'activen degut a un augment de calci intracel·lular i afecten a la transcripció, degradació proteica o senyalització cel·lular. L'acció de les diferents cinases es produeix a través de diferents vies. El complex CaMKII, per exemple, regula els nivells de fosforilació de Map2 (Vaillant et al., 2002).

Per altra banda, la senyalització lipídica també és clau en l'elongació i formació del arbre dendrític. La principal proteïna involucrada en aquesta senyalització és la cinasa PI3K. Així doncs, l'activació de PI3K produeix un augment de PIP<sub>3</sub>. Els diferents efectors de PIP<sub>3</sub>, com Akt o les petites GTPases, participen en el desenvolupament de l'arbre dendrític a través de la regulació del citoesquelet (Jan and Jan, 2010). A més a més, mTOR és una altra cinasa involucrada en la formació de l'arbre dendrític a través de la síntesi proteica. En concret, mTOR s'activa a través de la via de PI3K. (Urbanska et al., 2008).

La cinasa N-terminal de JUN 1 (JUN N-terminal kinasa, JNK1) és clau en la formació de l'arbre dendrític, ja que aquesta fosforila Map2. La unió de Map2 als microtúbuls és dependent de fosforilació (Conde and Caceres, 2009; Urbanska et al., 2008).

### 3.1.2 Senyals extracel·lulars en la formació de l'arbre dendrític

Les senyals extracel·lulars també regulen la morfogènesi dendrítica. En aquest sentit, les senyals extracel·lulars es poden dividir en tres grups:

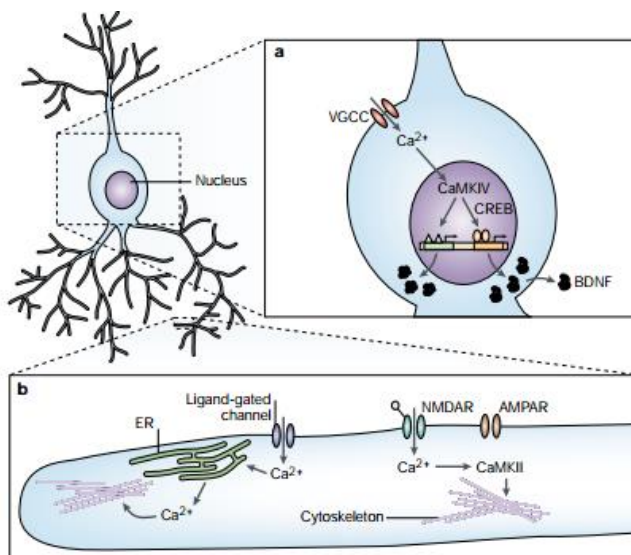
- **Molècules de guia i els seus receptors:** aquestes proteïnes actuen en la formació de l'arbre dendrític. En concret, participen en la direccionalitat i el creixement. Un dels exemples més coneguts són les semaforines, lligants dels receptors plexin-neuropilin. La seva funció és molt estudiada com a quimioatracent i quimiorepel·lent a nivell axonal. Tanmateix, també tenen un rol en la morfogènesi dendrítica. És el cas, per exemple, de SEMA3A, que promou la ramificació dendrítica. Altres factors neurotròfics que s'han vist involucrats en el creixement dendrític són el BDNF, NGF o BMP. Aquests factors tenen funcions contradictòries depenent del tipus neuronal. Així doncs, en funció del tipus de receptors expressats fomenten el creixement o l'inhibeixen (Urbanska et al., 2008).
- **Molècules d'adhesió i contacte:** actuen modulant el creixement i ramificació de l'arbre dendrític. Aquest tema es tractarà més detalladament al capítol de "Molècules d'adhesió". La interacció Delta-Notch està relacionada amb el contacte cèl·lula-cèl·lula i participa en la formació de l'arbre dendrític. En concret, està involucrada en la longitud de l'arbre dendrític en neurones hipocampals (Jan and Jan, 2010).
- **Proteïnes moduladores de l'activitat neuronal:** Són proteïnes que a través de la seva acció modifiquen les concentracions de calci intracel·lular. Aquests canvis són claus pel correcte desenvolupament de la neurona i la morfogènesi de les dendrites, com veurem a continuació.

### 3.1.3 Mecanismes dependents d'activitat en la formació de les dendrites

Durant el desenvolupament neuronal es produeixen canvis de potencials elèctrics espontanis degut a les fluctuacions de les concentracions de calci. Aquests canvis de calci produeixen l'activació de diferents vies que regulen tant la transcripció com les dinàmiques de citoesquelet (**figura 1.3.1**). Aquesta activació es produeix principalment a través de les vies de senyalització activades per la família de les CaMKs (Jan and Jan, 2010).

En les dendrites, aquests canvis de calci s'originen per l'activació de diferents receptors de glutamat. El canal de calci dependent de voltatge (voltatge-gated calcium channel, VGCC) està involucrat en la formació de l'arbre dendrític en neurones corticals, en la transcripció i en la

remodelació de les dendrites (Wong and Ghosh, 2002). A nivell de citoesquelet, l'activitat neuronal incrementa l'estabilitat de les ramificacions a través de Map1A i Map2 (Szebenyi et al., 2005; Vaillant et al., 2002).



**Figura 1.3.1. Esquema representatiu dels mecanismes dependents d'activitat de calci en el desenvolupament de la dendrita.**

Canvis de calci produeixen l'activació de diferents vies que regulen la transcripció (a) o dinàmiques de citoesquelet (b). Principalment a través de les vies de senyalització activades per la família de les CaMKs. Els receptors de glutamat, VGCC, NMDAR i AMPAR estan involucrats en l'increment de calci. Adaptat de (Wong and Ghosh, 2002).

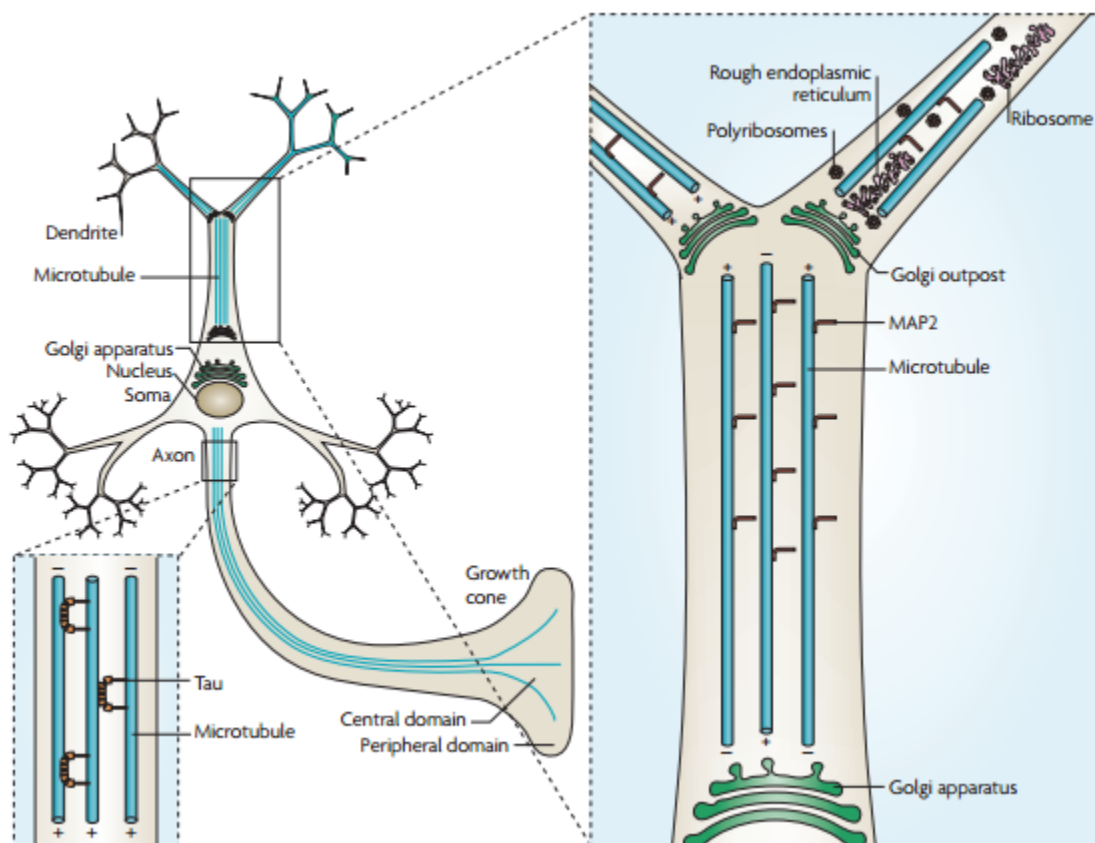
### 3.1.4 Tràfic vesicular i remodelació de les membranes

En les dendrites en formació hi ha un elevada incorporació de membranes *de novo*. Aquest procés requereix diferents elements: el citoesquelet, les proteïnes involucrades en el transport vesicular i els orgànuls de síntesi (**figura I.3.2**). Per una banda, el citoesquelet actua de suport físic per a les molècules de transport. Per altra banda, els orgànuls involucrats són l'aparell de Golgi de lloc d'avançada (GoOP), el reticle endoplasmàtic rugós i poliribosomes. Aquests orgànuls permeten la síntesi proteica específica.

El correcte posicionament i funcionament del GoOP és clau en el procés de ramificació. El GoOP es troba desconnectat de l'aparell de Golgi somal i es localitza a les zones de ramificació en les dendrites. Realitza una funció de tràfic específic de proteïnes necessàries pel creixement i formació de l'arbre dendrític. D'aquesta manera, la posició del GoOP condiona la formació de microtúbuls a les noves ramificacions (Conde and Caceres, 2009). S'han identificat moltes proteïnes involucrades en el posicionament del GoOP, com per exemple les dineïnes. Modificacions en les subunitats que formen les dineïnes causen problemes en el procés de ramificació associat al GoOP (Zheng et al., 2008).

D'altra banda, LIS-1 és una proteïna associada a microtúbuls que interacciona amb dineïnes. La seva funció està relacionada amb el transport dependent de microtúbuls. S'ha vist que està involucrada en la longitud de les dendrites i la seva ramificació en neurones hipocampals (Liu et al., 2000).

Tanmateix, el procés d'endocitosis també és necessari per la internalització de receptors i senyals externes. Per altra banda, el tràfic vesicular d'exocitosis, mediat per SNARE i en el qual participen proteïnes com les dineïnes i Rap1, també és clau en la morfogènesi dendrítica (Jan and Jan, 2010; Urbanska et al., 2008).



**Figura I.3.2.** Esquema representatiu de l'organització dels microtúbuls i diferents orgànuls al llarg de la neurona.

El compartiment axonal i dendrític presenten una composició diferent tant a nivell de citoesquelet com de orgànuls. En les dendrites trobem el Golgi de lloc d'avançada (Golgi outpost), reticle endoplasmàtic rugós i poliribosomes. Adaptat de (Conde and Caceres, 2009).

### 3.2 Factors de transcripció i proteïnes d'unió a l'ADN involucrats en el desenvolupament dendrític i axonal

S'han identificat molts factors de transcripció i proteïnes d'unió a l'ADN crucials pel desenvolupament de l'arbre dendrític i diferenciació de les neurones. En aquest sentit, la combinació de diferents factors de transcripció creen la identitat específica de cada tipus neuronal i la formació del seu arbre dendrític i el terminal axonal. Alguns exemples d'aquests factors de transcripció són Neurogenin-2, Cux1, Stab2 o Ctip2.

Així doncs, Neurogenin-2 és un factor de transcripció involucrat en la formació i creixement de l'arbre dendrític. Cux-1/2 són proteïnes d'unió a l'ADN, codificades per un gen homeòtic amb diferents funcions biològiques. En les neurones corticals, aquests factors són essencials per la formació de l'arbre (Cubelos et al., 2010). El factor específic neuronal associat a BRG-1 (neuron-specific BRG1-associated factor, nBAF) forma un complex de remodelació de la cromatina específic de neurones postmitòtiques i rellevant en la morfogènesi dendrítica (de la Torre-Ubieta and Bonni, 2011; Jan and Jan, 2010; Urbanska et al., 2008).

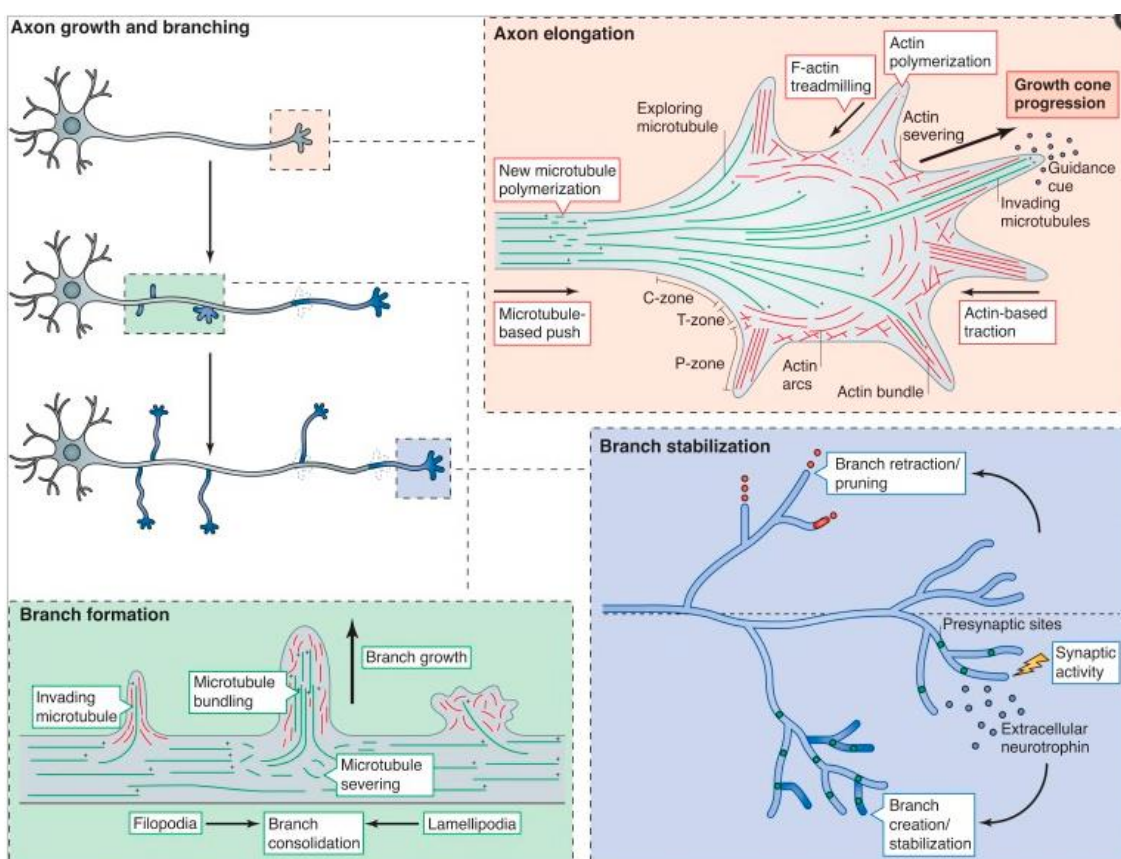
A nivell axonal, Satb2 és un factor de transcripció que regula la maduració axonal i la formació de projeccions (Alcamo et al., 2008). Ctip2 és un factor de transcripció que s'expressa en neurones del còrtex de capa IV-V, es troba regulat per Satb2 i controla la formació de les projeccions axonals (Chen et al., 2008).

Hi ha moltes proteïnes d'unió a l'ADN que són dependents d'activitats. L'augment de calci produït per senyals externes produeix una activació de la via de senyalització de CaMKI/CaMKK, cosa que provoca una activació de proteïnes d'unió a l'ADN (**figura I.3.1**). És el cas de proteïnes com la proteïna d'unió a la resposta de AMPc (cAMP response element-binding protein, CREB), la proteïna d'unió a CpG-metilat 2 (Methyl-CpG-binding protein 2, MECP2), la proteïna transactivadora a la resposta de Calci (Ca<sup>2+</sup>- responsive transactivator, CREST) i el factor de diferenciació neurogènica 1 (neurogenic differentiation factor 1, NeuroD1). Aquestes proteïnes de resposta a calci actuen en la morfogènesi de les dendrites (Urbanska et al., 2008; Wong and Ghosh, 2002).

### 3.3 Ramificació de l'axó

Els arbres axonals són molt importants pel processament de la informació sensorial i l'aprenentatge. Els axons de les neurones corticals i hipocampals excitatòries formen prolongacions molt llargues amb ramificacions i arbres terminals. Aquestes ramificacions i arboritzacions ajuden a connectar diferents regions del cervell. En aquest sentit, conèixer els mecanismes involucrats en l'arborització de l'axó és essencial per comprendre com es formen els circuits neuronals, l'efecte en malalties del desenvolupament i per trobar noves dianes terapèutiques en regeneració o malalties neurodegeneratives.

Per estudiar aquests processos es poden utilitzar els cultius neuronals. En l'estadi 4 Banker *in vitro*, l'axó s'elonga i forma ramificacions (**figura I.3.3**). L'estructura axonal està molt definida, i es produeix una elevada incorporació de proteïnes de membrana i citoesquelet per tal que aquest s'elongui i es ramifiqui.



**Figura I.3.3. Esquema representatiu dels canvis a nivell de citoesquelet durant el procés d'elongació i ramificació de l'axó.**

El con de creixement explora el medi extern i internalitza les senyals que permeten elongar l'axó, panell superior a la dreta. Per la formació de ramificacions, panell inferior a l'esquerra, es produeix una acumulació d'actina que dona lloc a un fil-lopodí o lamel·lipodi, aquesta estructura rica en actina es estabilitzada per microtúbuls. Finament, es forma un con de creixement en la ramificació que permet l'exploració de l'exterior. Adaptat de (Lewis et al., 2013).



### 3.3.1 Citoesquelet en la ramificació axonal

La ramificació i l'elongació de l'axó requereixen una regulació de les dinàmiques del citoesquelet d'actina i microtúbuls. Això permet la formació de les estructures presinàptiques. Les molècules associades als diferents citoesquelets són claus en aquest procés.

El procés de formació de ramificacions axonals està molt caracteritzat i segueix la següent seqüència (**figura 1.3.3**) (Conde and Caceres, 2009; Kalil and Dent, 2014; Lewis et al., 2013):

1. Es produeixen protuberàncies a la membrana degut a l'acumulació de filaments d'actina, formant fil·lopodis o lamel·lipodis. Per la formació d'aquestes estructures es necessiten les proteïnes involucrades en la nucleació, ramificació i elongació dels filaments d'actina. D'aquesta manera, les molècules associades al citoesquelet d'actina i que regulen el con de creixement, com Arp2/3 o ENA/VASP, estan involucrades en la ramificació axonal en neurones hipocampals.
2. Els microtúbuls de l'axó es fragmenten i entren a la protuberància. En aquest procés participen proteïnes com Spastin i Katanina, que tallen els microtúbuls. La proteïna Septin7 facilita la penetració dels microtúbuls a les protuberàncies. Un increment de la inestabilitat dels microtúbuls facilita la formació de les ramificacions.
3. Es produeix un procés de consolidació de l'estructura formada. Concretament, s'estabilitza el citoesquelet de microtúbuls de l'interior de l'estructura s'estabilitza. La longitud de la ramificació depèn del con de creixement, el qual es forma en la ramificació i respon a les senyals externes.

D'aquesta manera, durant la ramificació dels axons és necessari un estadi inicial de desestabilització dels microtúbuls per la penetració a les protuberàncies, i una posterior estabilització per consolidar les estructures. Així doncs, existeix un control molt estricte de l'estabilitat dels microtúbuls. En aquest sentit, les MAPs són claus en el procés de ramificació: modificacions en les MAPs o les proteïnes associades als microtúbuls presents en l'axó, com Tau, Map1B, doublecortin, APC, Spastin o KIF2A, produeixen canvis en el nombre de ramificacions (Lewis et al., 2013).

La funció de Map1B és clau en el procés de ramificació perquè actua d'enllaç entre els microtúbuls i el citoesquelet d'actina, permetent l'estabilització dels microtúbuls que penetren a les protuberàncies inicials d'actina (Mohan and John, 2015).

En conjunt, la regulació de les dinàmiques d'actina i microtúbuls són claus per la ramificació. És per aquest motiu que trobem diferents vies involucrades. Igual que en l'arborització dendrítica, en l'arborització axonal també és clau la família de les petites GTPases per la seva funció en la regulació del citoesquelet d'actina i microtúbuls (Conde and Caceres, 2009; Kalil and Dent, 2014; Lewis et al., 2013).

#### **Cinases**

Diferents cinases estan involucrades en la formació de l'arbre dendrític. En aquest sentit, la cinasa PI3K actua regulant diferents proteïnes, com Rac1, que participen en la formació de l'axó. Així doncs, l'activació de PI3K incrementa la ramificació. En canvi, la cinasa PTEN, amb una activitat oposada a PI3K, redueix la complexitat de l'axó.

Un altre exemple és la cinasa MAPK, activada per Netrina1. MAPK inactiva JNK, que afecta l'estabilitat dels microtúbuls produint canvis en la ramificació axonal de les neurones corticals. Tanmateix, GSK3 $\beta$  és una cinasa que controla la fosforilació de moltes MAPs involucrades en l'estabilitat de microtúbuls en el compartiment axonal, com pot ser Tau, Map1B o APC. La

fosforilació d'aquestes proteïnes per GSK3 $\beta$  produeix que es desuneixin dels microtúbuls, per tant un augment de la inestabilitat (Conde and Caceres, 2009).

En general, el control de l'activitat de les diferents cinases és clau durant el procés de ramificació axonal per l'efecte que exerceixen sobre l'estabilitat del citoesquelet de microtúbuls.

### **3.3.2 Senyals extracel·lulars en la formació de l'axó**

Diferents senyals externes estan involucrades en la guia axonal, com les molècules de guia, els factors de creixement o morfògens.

En aquest sentit, les mateixes famílies de molècules de guia que participen en la formació de l'arbre dendrític participen en la formació de l'arbre axonal. Alguns exemples són els factors Neurotròfics, Semaforines, Netrines o Efrines que a través dels seus receptors regulen la direccionalitat i el creixement axonal. Alguns exemples en concret són Netrina 1 i SEMA3A que participen en la formació i ramificació axonal en neurones corticals i hipocampals, respectivament.

Molts factors de creixement actuen en la formació i guia axonal, com la família de FGFs, NGFs i BDNF, que afecten la ramificació de les corticals i hipocampals.

A nivell de morfògens, cal destacar el paper de la família de Wnts, molt important en el desenvolupament del cervell i la morfogènesi neuronal. Diferents molècules de la família de Wnt participen en la guia i ramificació axonal de diferents tipus neuronals, com Wnt7A en les neurones granulars o Wnt3A en les motoneurones (Kalil and Dent, 2014).

Tanmateix, la combinació de diferents receptors i molècules provoca la repulsió o l'atracció del con de creixement. L'efecte d'aquestes senyals també depèn de la regió axonal, con de creixement o axó. Aquestes molècules, per exemple, provoquen l'aparició de fil·lopodis i lamel·lipodis al llarg de l'axó, estructures prèvies a la formació de ramificacions axonals (Kalil and Dent, 2014).

### **3.3.3 Mecanismes dependents d'activitat**

L'activitat neuronal en forma de canvis en la concentració de calci intracel·lular regula la guia, la formació i la ramificació de l'axó.

Hi ha diferents senyals externes que activen canvis de calci, com Netrina 1 i NGF. Aquests canvis en els nivells de calci provoquen l'activació de les vies de senyalització regulades per la família de les CaMKs. Un exemple podria ser el cas de Rho-A, activat a través de CaMKII, l'activació del qual modifica les dinàmiques d'actina (Kalil and Dent, 2014; Lewis et al., 2013).



## 4. Sinaptogènesi



L'aprenentatge, les emocions i la capacitat d'integrar i processar la informació externa recau en la manera en que més de 1000000000000 neurones estan connectades entre elles.

L'expressió gènica regula l'aparició de centenars de tipus neuronals. L'organització del citoesquelet origina i condiciona la morfologia de cadascuna, i l'acumulació específica de desenes de proteïnes permet el pas dels impulsos elèctrics entre totes elles.

El procés de connexió i el manteniment de les estructures que permeten les connexions entre les neurones són claus pel funcionament neuronal i el processament de la informació. D'aquesta manera, la forma dels arbres dendrítics i axonals condicionen el nombre de connexions que reben i projecten.

Durant el desenvolupament neuronal, les dendrites són molt dinàmiques: s'elonguen o es retrauen. Es produeixen canvis constants per facilitar la correcta connexió, formació de sinapsis i creació de circuits neuronals. D'aquesta manera, les dendrites pateixen un procés de maduració fins a establir-se. Paral·lelament a aquesta maduració es formen els contactes sinàptics. Aquest procés de formació de sinapsis s'anomena sinaptogènesi. En concret, l'estabilització de les dendrites i les sinapsis estan relacionades: la sinaptogènesi facilita la maduració de la dendrita, i la pèrdua d'activitat neuronal induïx la desestabilització d'aquestes. Tanmateix, l'axó té un procés de refinament de les ramificacions i contactes. Aquesta plasticitat de les dendrites i els axons es redueix al llarg del temps a mesura que els circuits neuronals es formen, maduren i s'estabilitzen (Koleske, 2013; Waites et al., 2005; Wong and Wong, 2000).

Les neurones connecten entre elles formant sinapsis. La majoria de sinapsis en mamífers són químiques. Les sinapsis químiques excitatòries, majoritàries en el cervell, són unions asimètriques. Quan s'observen en microscopia electrònica, s'aprecia una elevada densitat postsinàptica. L'axó forma una estructura presinàptica que conté les vesícules amb neurotransmissors i la maquinària necessària per a la unió de les vesícules a la membrana. Aquesta estructura s'anomena botó sinàptic. La dendrita forma estructures postsinàptiques que contenen els receptors dels neurotransmissors i una complexa estructura molecular per integrar la senyal rebuda. En la majoria de sinapsis glutamatèrgiques, l'estructura postsinàptica està inclosa en les espines, que són protuberàncies que apareixen en les dendrites durant el procés de maduració neuronal. Entre les dues estructures, a la zona de contacte, es pot observar una elevada concentració de proteïnes d'adhesió. D'aquesta manera, els potencials d'acció es propaguen al llarg de l'axó fins al botó sinàptic. En el botó, els potencials d'acció provoquen l'alliberació dels neurotransmissors que s'uneixen a receptors específics en l'espina postsinàptica. Aquests canals originen un nou potencial elèctric (Gray, 1963; Palay, 1956; Waites et al., 2005).

#### 4.1 Estabilització de dendrites i formació de sinapsis

Les dendrites ocupen una àrea determinada degut a tres principis (Jan and Jan, 2010):

- Les dendrites de neurones del mateix tipus no ocupen la mateixa àrea, degut a mecanismes de repulsió
- Dendrites del mateix tipus neuronal s'agrupen per cobrir àrees més extenses sense solapar-se una amb l'altre.
- Dendrites de diferents tipus neuronals poden coexistir en la mateixa regió.

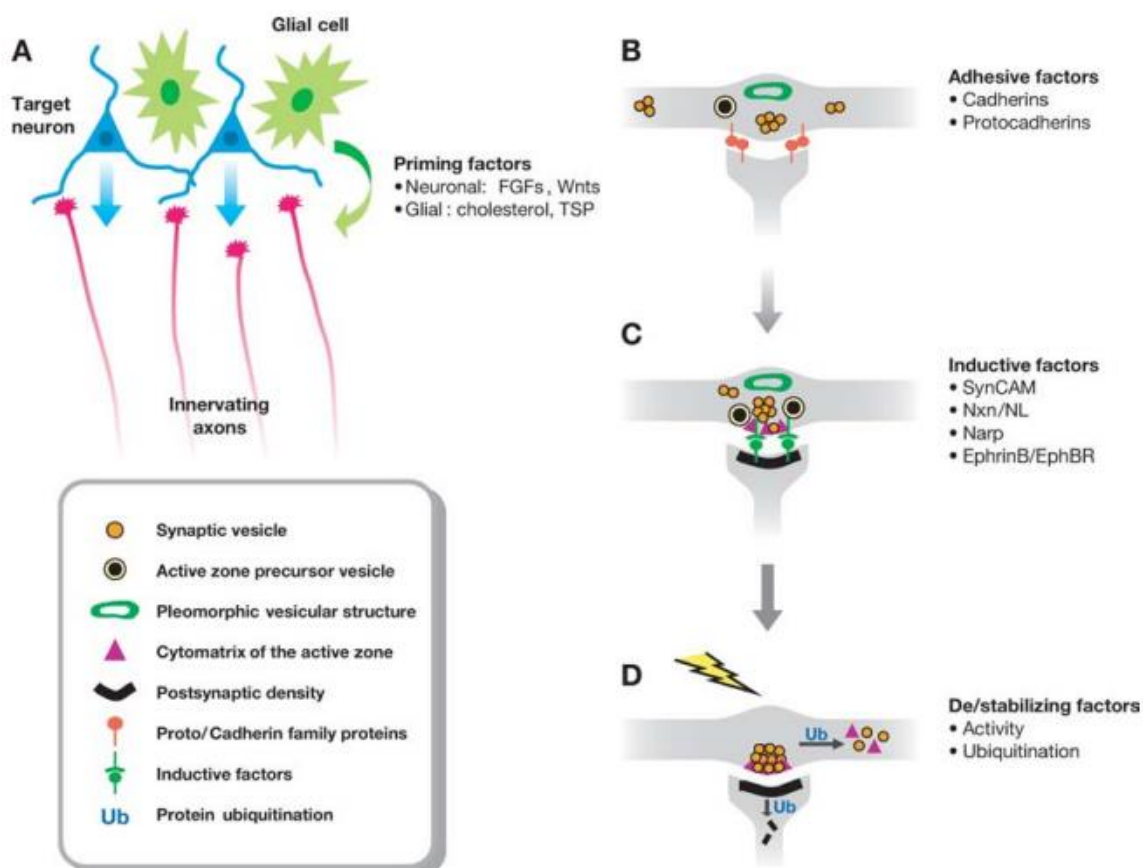
Durant la diferenciació neuronal les neurones migren, formen les dendrites, i paral·lelament expressen les proteïnes necessàries per formar els circuits neuronals. En aquest sentit, les proteïnes necessàries per formar les estructures presinàptiques i postsinàptiques es transporten a les regions d'interès (Waites et al., 2005).

En el procés de sinaptogènesi (**figura 1.4.1**) trobem moltes molècules involucrades. Inicialment, les senyals externes regulen la direccionalitat i la formació de l'arbre dendrític i l'axonal.

Posteriorment, aquestes senyals, les proteïnes de la matriu extracel·lular i les molècules d'adhesió produeixen l'agrupació i la reordenació de les proteïnes involucrades en la sinaptogènesi. Per exemple, les neurotrofines o semaforines regulen processos d'encebat de la sinaptogènesi. Un altre element clau en la sinaptogènesi és la funció de la glia. S'ha vist que el procés de sinaptogènesi està modulats per la glia. En concret, el procés de sinaptogènesi s'inicia quan la glia està posicionada i és funcional en les diferents regions del cervell. A més a més, la importància de la glia es manté al llarg del temps. En el cervell adult modula les sinapsis en molts aspectes (Jebelli et al., 2015).

La sinaptogènesi s'inicia amb un reconeixement molecular entre les membranes (**figura I.4.1**). Aquest reconeixement és altament depenent de molècules d'adhesió. En concret, les molècules d'adhesió regulen l'àrea d'ocupació de les dendrites i la formació de sinapsis a través d'unions homofíliques o heterofíliques i repulsions (Jan and Jan, 2010; Waites et al., 2005). Hi ha moltes molècules d'adhesió involucrades en el procés de sinaptogènesi. La seva funció es detalla en el capítol "Molècules d'adhesió". A nivell general, les molècules d'adhesió involucrades en la sinaptogènesi es poden dividir en (Waites et al., 2005):

- **Molècules que promouen la unió entre membranes:** són proteïnes que participen en diferents aspectes del desenvolupament i maduració neuronal, però no són exclusives de formació de sinapsis. Formen part d'aquest grup les Cadherines i les Protocadherines (Chen and Maniatis, 2013; Seong et al., 2015).



**Figura I.4.1. Esquema representatiu del procés de sinaptogènesi.**

A) Les senyals externes promouen el desenvolupament i diferenciació neuronal. La neurona forma les dendrites i els axons. B) Les diferents molècules d'adhesió promouen els contactes entre axons i dendrites, com les Cadherines i les Protocadherines. C) Determinades molècules d'adhesió promouen el desenvolupament i maduració de la sinapsis. Es formen les estructures presinàptiques i postsinàptiques, s'acumulen proteïnes necessàries pel correcte funcionament de la neurotransmissió química. D) Les sinapsis estan sotmeses a factors que la potencien o la desestabilitzen. Adaptat de (Waites et al., 2005).

- **Molècules de formació de sinapsis:** són proteïnes que participen en l'acumulació de proteïnes específiques i necessàries per a la sinapsis, en el compartiment presinàptic i al postsinàptic. Formen part d'aquest grup Efrines i SynCAM (Frei and Stoeckli, 2016).

Les proteïnes d'adhesió permeten el contacte entre membranes i ajuden a l'agrupació de les proteïnes necessàries per formar la sinapsis. Posteriorment hi ha una aportació de molècules necessàries per la formació i maduració de les sinapsis. Aquest procés té lloc a través del transport vesicular.

A nivell presinàptic, en les sinapsis immadures trobem una aportació de vesícules de baixa densitat proteica. Aquestes serien les precursors de les vesícules sinàptiques. A més a més, trobem estructures tubulovesiculars d'origen endosomal i de l'aparell de Golgi que ajuden a la síntesi proteica específica i al reciclatge de membranes. En aquest estadi de la sinaptogènesi, la majoria de vesícules que es localitzen en la zona presinàptica contenen proteïnes per formar la zona activa i permetre l'exocitosi de les vesícules que contenen neurotransmissors.

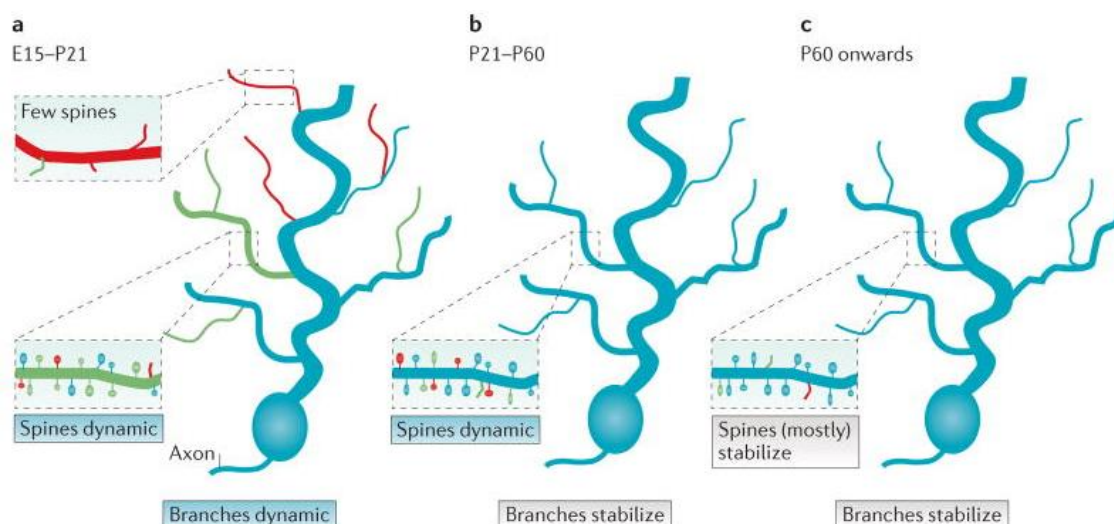
A nivell postsinàptic, les proteïnes que formen les espines s'acumulen de manera gradual per formar la densitat postsinàptica. Les proteïnes presinàptiques, en canvi, es troben agrupades en vesícules. Així doncs, les proteïnes postsinàptiques són transportades de manera específica a les dendrites. Es produeix un transport específic de les cinesines, com KIF1B, que transporta PSD-95, o la KIF17, que transporta el receptor de NMDA. Altres proteïnes citosòliques que formen part de l'estructura postsinàptica queden retingudes o són fruit de la transcripció específica, com CaMKII i Shank (Namba et al., 2015; Waites et al., 2005).

Posteriorment, les sinapsis presenten un procés de maduració durant el qual incrementen el tamany i s'estabilitzen les estructures. Trobem una correlació entre les estructures presinàptiques i postsinàptiques, entre el tamany dels botons i el cap espines, i entre les vesícules i la densitat postsinàptica. La correlació entre estructures presinàptiques i postsinàptiques es manté degut a les molècules d'adhesió i la interacció amb les molècules del citoplasma de cada estructura. Tanmateix, hi ha molts mecanismes involucrats en la morfogènesi de les estructures: molècules d'adhesió, proteïnes associades als citoesquelets d'actina i microtúbuls i mecanismes dependents de calci. D'aquesta manera, les característiques funcionals de les sinapsis es modifiquen al llarg de la maduració, hi ha un increment de la quantitat de vesícules i una modificació de la composició i resposta dels receptors a la zona presinàptica i postsinàptica, respectivament (Waites et al., 2005; Zheng and Poo, 2007).

## 4.2 Remodelació de la sinapsis

Durant el procés de maduració, les neurones eliminen l'excés de ramificacions i contactes sinàptics. Un cervell postnatal conté més espines que un cervell adult. El procés d'eliminació dels contactes i remodelació de les dendrites i axó són essencials per a la correcta formació dels circuits neuronals. En aquest procés participen vies de senyalització que activen caspases i calpaines necessàries per tal d'eliminar aquest excés. En aquest sentit, existeix una regulació espacial i temporal de les vies involucrades en l'activació del proteosoma a través de la ubiquitinització i la compartimentalització de la senyal de calci (Haas and Broadie, 2008).

A més a més, al llarg del procés de maduració neuronal les dendrites i les espines perden de forma gradual el dinamisme estructural (**figura 1.4.2**).



**Figura 1.4.2. Esquema representatiu de l'evolució de l'estabilitat de les dendrites i de les espines al llarg de la maduració neuronal.**

Durant el desenvolupament, tant les dendrites com les espines presenten una elevada plasticitat. En el procés de maduració s'estabilitzen algunes dendrites i les altres són eliminades, de color blau i vermell respectivament. De forma gradual les dendrites esdevenen estables, en canvi, les espines mantenen un grau de plasticitat per remodelar la forma de la sinapsis i adaptar-se a les senyals que provenen de l'axó. Al final del procés de maduració hi ha un elevat nombre d'espines que són estables durant períodes elevats de temps, fins a mesos o dècades en humans. Adaptat de (Koleske, 2013).

En el desenvolupament, tant les dendrites com les espines presenten una elevada plasticitat. Posteriorment, durant el procés de maduració s'estabilitzen algunes dendrites i les altres són eliminades. En aquest període l'activitat en les espines i l'estabilització de les dendrites està molt relacionat (Wong and Wong, 2000). De forma gradual les dendrites esdevenen estables, en canvi, les espines mantenen un grau de plasticitat per remodelar la forma de la sinapsis i adaptar-se a les senyals que provenen de l'axó. D'aquesta forma s'aconsegueix l'estabilitat de les estructures al llarg del temps. Aquesta estabilitat és crucial per mantenir les connexions neuronals (Yang et al., 2009). Al final del procés de maduració, un elevat nombre d'espines són estables durant períodes elevats de temps, fins a mesos o dècades en humans (Trachtenberg et al., 2002). La pèrdua de l'estabilitat tant de dendrites com d'espines causen diferents tipus de patologies, com psiquiàtriques o neurodegeneratives (Kulkarni and Firestein, 2012).

L'activitat neuronal és essencial en aquest procés de maduració de l'arbre dendrític. L'augment de calci conseqüència de l'activitat neuronal és el principal factor implicat en la remodelació i maduració neuronal. S'eliminen les dendrites que reben menys senyals, i es potencien i s'estabilitzen les que tenen una major activitat. En aquest mecanisme participen els receptors dels diferents neurotransmissors que promouen l'increment de calci, el qual activa les vies que afecten la remodelació de les dendrites i sinapsis (Dillon and Goda, 2005). El calci regula les dinàmiques d'actina i microtúbuls en l'espina dendrítica claus per l'estabilització i potenciació. De forma oposada, el calci també regula la ubiquitinització de proteïnes que regulen la sinapsis a nivell postsinàptic o presinàptic. Aquest procés pot originar l'eliminació de sinapsis (Speese et al., 2003; Zheng and Poo, 2007).

### 4.3 El citoesquelet en la formació de les espines dendrítiques

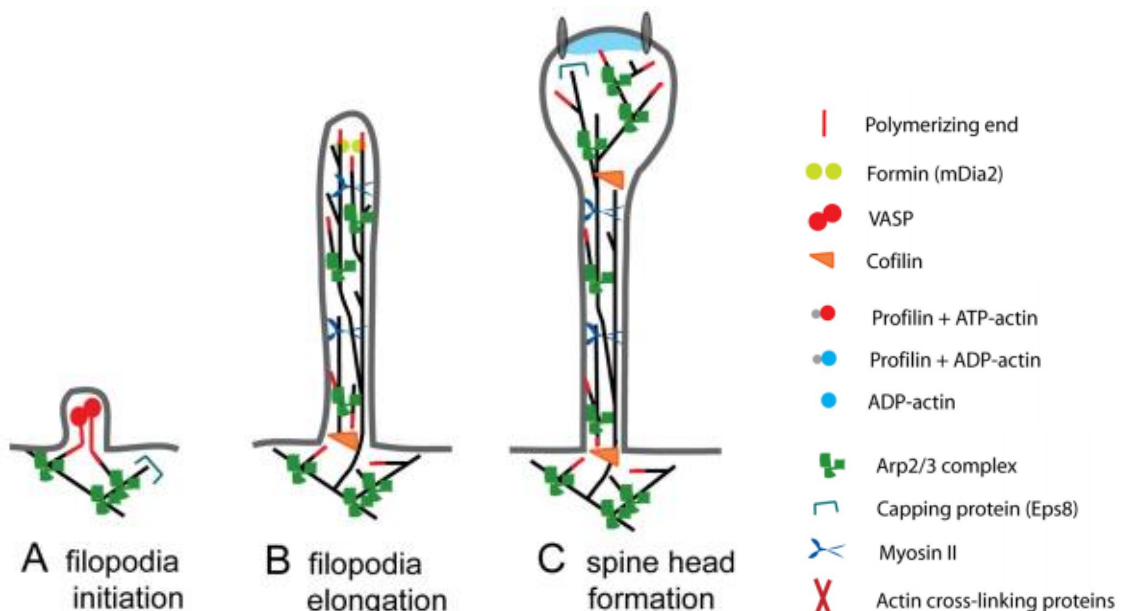
Les espines dendrítiques són les estructures postsinàptiques presents en les dendrites. Contenen totes les proteïnes necessàries per integrar les senyals procedents dels botons presinàptics. Les espines dendrítiques són estructures molt riques en actina. Durant el procés de sinaptogènesi, les dendrites formen fil·lopodis rics amb actina que s'estabilitzen en contacte



amb l'axó. La seva formació segueix uns estadis definits (Hotulainen and Hoogenraad, 2010) (figura I.4.3) :

- Es forma un fil·lopodi a la dendrita. Hi ha moltes hipòtesis sobre l'origen de la formació d'aquest fil·lopodi, de forma general, les proteïnes d'adhesió i proteïnes associades a actina estan involucrades en aquest procés.
- El fil·lopodi s'allarga degut a l'acció de proteïnes de nucleació i elongació. En la formació d'aquesta estructura d'actina participen proteïnes característiques dels lamel·lipodis com Arp2/3, Ena/VASP i miosina. Aquestes proteïnes ajuden a crear una estructura en 3D.
- A la punta de l'espina, es forma una estructura ramificada d'actina, que esdevindrà el cap de l'espina. Allà trobem una elevada activitat de Arp2/3 i proteïnes estabilitzadores dels filaments d'actina..
- S'acumulen proteïnes a la membrana de l'espina i al citosol que controlen el tamany del cap i regulen la seva estabilització. A més a més, a la membrana s'incorporen els diferents receptors de neurotransmissors necessaris per l'activitat neuronal.

Les espines són estructures molt riques amb actina. Tot i això, el citoesquelet de microtúbuls juga un paper clau en l'estabilització de les espines. S'ha descrit que l'activitat neuronal produeix canvis en la dinàmica dels microtúbuls. Els canvis de calci produeixen una cascada de successos que modifiquen les dinàmiques del citoesquelet de microtúbuls. Això produeix l'entrada de microtúbuls a l'espina i una remodelació i potenciació de l'estructura. Els microtúbuls són el suport pel transport vesicular, que també ajudaria a la potenciació de l'espina (Dent, 2017). En aquest sentit, totes les proteïnes que interaccionen amb el citoesquelet d'actina i el de microtúbuls a l'interior de l'espina dendrítica són claus per l'estabilització (Caceres et al., 1983; Conde and Caceres, 2009).



**Figura I.4.3. Esquema representatiu de la dinàmica d'actina en la formació de les espines dendrítiques.**

A) Es forma un fil·lopodi a la dendrita. B) Degut a l'acció de proteïnes de nucleació i elongació el fil·lopodi s'allarga, degut a l'acció de proteïnes com Arp2/3, Ena/VASP i miosina. Aquestes proteïnes ajuden a crear una estructura en 3D. C) A la punta de l'espina, es forma una estructura ramificada d'actina, que esdevindrà el cap de l'espina. Hi ha una elevada activitat de Arp2/3 i proteïnes estabilitzadores dels filaments d'actina. S'acumulen proteïnes a la membrana de l'espina i al citosol que controlen el tamany del cap i regulen la seva estabilització. Adaptat de (Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

#### 4.4 Estructura de l'espina dendrítica

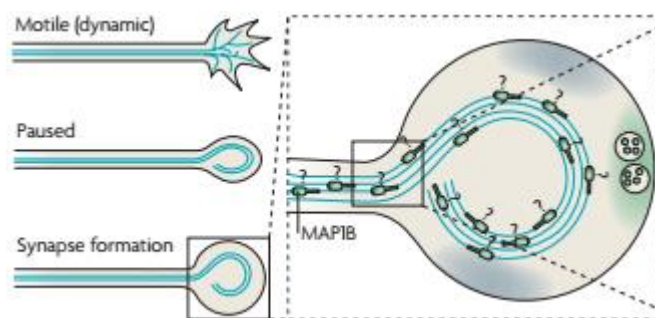
L'espina dendrítica es basa en el citoesquelet d'actina. A més a més, l'espina conté centenars de proteïnes que controlen diferents aspectes. A nivell funcional, els paràmetres més rellevants són: la forma de l'espina, el coll de l'espina i els receptors. Aquests paràmetres controlen els canvis de potencial postsinàptics i la possibilitat de transmetre la senyal al compartiment somatodendrític. Les diferents proteïnes involucrades en l'estructura de l'espina es poden agrupar en les següents categories (Sala and Segal, 2014):

- **Proteïnes d'unió al citoesquelet d'actina:** En l'espina, el citoesquelet d'actina forma una estructura característica anomenada espinoesquelet. Tanmateix, trobem moltes proteïnes associades a actina; com per exemple les proteïnes d'encaputxament (CP o VASP), o les de nucleació (WAVE 1 o WAVE 3) i proteïnes motores associades a actina, com les miosines. Cal remarcar les petites GTPases i les diferents cinases que controlen la dinàmica del citoesquelet d'actina. Per aquest motiu també es detecten a l'espina dendrítica.
- **Proteïnes d'interacció del citoesquelet de microtúbuls i d'actina:** El citoesquelet de microtúbuls és clau en les espines perquè serveix de suport pel transport de vesícules necessàries pel funcionament de la sinapsis. Cal remarcar les proteïnes que interaccionen amb el citoesquelet d'actina i de microtúbuls, com per exemple les proteïnes Map1B, Map2 o EB3 que estan associades al citoesquelet de microtúbuls i interaccionen amb el citoesquelet d'actina i ajuden a l'òptim funcionament de la dinàmica de l'espina.
- **Proteïnes associades a l'activitat de les petites GTPases:** La família de les petites GTPases controlen la polimerització de l'actina, i per tant la forma de l'espina
- **Molècules d'adhesió, matriu extracel·lular i receptors:** la majoria de proteïnes d'adhesió que tenen una funció en desenvolupament dendrític també tenen una funció en la formació sinàptica, com per exemple Neurologin 1 i 3 involucrats en la formació de les connexions hipocampals.
- **Proteïnes de la densitat postsinàptica (postsynaptic density, PSD):** La PSD és una regió on es concentren diferents proteïnes necessàries per al funcionament de l'espina postsinàptica, com per exemple CaMKII o receptors. Les principals proteïnes adaptadores que ajuden a l'agrupació són: la proteïna de densitat postsinàptica 95 i les proteïnes de la família Shank.
- **Factors de transcripció i proteïnes d'unió a ARNm:** En les espines existeix una aportació específica de proteïnes degut a la transcripció local de ARNm.
- **Receptors i canals iònics:** Les espines tenen diferents proteïnes involucrades en els canvis de potencials. Els receptors dels diferents neurotransmissors produeixen canvis de potencials a través de la seva acció. Trobem dos tipus de receptors, els receptors que són canals iònics i els receptors metabotòpics. Aquests últims no formen canals iònics però activen cascades de senyalització que provoquen canvis de potencials. Trobem diferents canals: de Sodi, de Potassi i de Calci. Cal destacar els canals de NMDA i AMPA. Aquests canals són receptors de Glutamat involucrats amb els canvis de potencials en les sinapsis excitatòries.  
Per altra banda, en les espines madures trobem canals de VGCC involucrats tant en la formació com l'estabilització de les sinapsis.

## 4.5 Refinament del terminal axonal

Durant els processos de creixement i formació de les ramificacions axonals es genera un excés de ramificacions que, igual que les dendrites, s'eliminen durant el procés de maduració neuronal i formació del circuits neuronals. En aquests processos s'activen mecanismes de degradació induïts per caspases. L'activitat neuronal també és essencial per la remodelació i refinament del terminal axonal, el calci activa cascades que regulen la ubiquitinització (Waites et al., 2005).

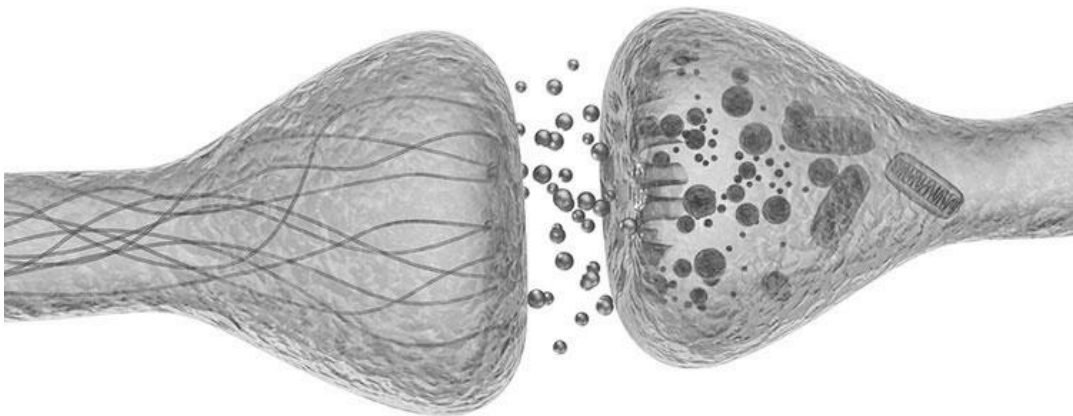
A nivell estructural, el citoesquelet de microtúbuls és molt important per la formació de contactes sinàptics en la regió presinàptica. A diferència de les espines, el citoesquelet de microtúbuls és clau en l'exploració i formació dels botons (**figura 1.4.4**). Els microtúbuls presenten una dinàmica diferent segons si el con de creixement està explorant el medi, en pausa o en formació de botons. En els casos en que el con de creixement es troba en pausa o formació de sinapsis el citoesquelet forma un llaç. Hi ha moltes proteïnes associades en la dinàmica de microtúbuls vinculades en la formació del llaç, com per exemple Map1B. Map1B és clau en l'estabilització del citoesquelet durant la formació del llaç, permetent la sinaptogènesi (Conde and Caceres, 2009).



**Figura 1.4.4. Esquema representatiu de la dinàmica de microtúbuls en la formació del botó sinàptic.**

Panell esquerra, els microtúbuls presenten una dinàmica diferent segons si el con de creixement està explorant el medi, en pausa o en formació de botons. En el cas de pausa i formació de sinapsis el citoesquelet forma un llaç. Ampliació a la dreta, hi ha moltes proteïnes associades en la dinàmica de microtúbuls vinculades en la formació del llaç, com MAP1B que és clau en l'estabilització del citoesquelet en la formació del llaç que permet la sinaptogènesi. Adaptat de (Conde and Caceres, 2009).

## 5. Plasticitat adulta



El cervell no es una estructura rígida: per facilitar l'adaptació a l'entorn i l'aprenentatge conté mecanismes plàstics. Aquests mecanismes permeten canvis en la citoarquitectura de la neurona per adaptar-se millor a les necessitats d'aprenentatge.

Durant el desenvolupament, les neurones es connecten i té lloc un procés de refinament de les estructures. Tant les dendrites com els axons pateixen un procés de maduració i estabilització que defineix les estructures neuronals. Aquestes estructures permeten el processament de la informació. Així doncs, el cervell necessita unes estructures estables per integrar les senyals externes. En concret, la capacitat d'integració i processament depèn de com de robust és el sistema de connexions.

El sistema nerviós adult ha de ser suficientment estable per tal de mantenir les connexions i flux d'informació. Al mateix temps, però, necessita un grau de flexibilitat per adaptar-se i integrar les noves senyals externes. Aquesta capacitat s'anomena plasticitat adulta i permet canvis en les connexions neuronals per adaptar-se. Hi ha dos processos involucrats en la plasticitat adulta: la plasticitat sinàptica i la neurogènesi adulta.

## 5.1 Plasticitat sinàptica adulta

En la plasticitat sinàptica adulta es produeix una remodelació de l'estructura postsinàptica i presinàptica. Aquesta remodelació permet a la neurona adaptar-se a noves senyals, potenciant, deprimint, creant o eliminant les sinapsis. En cervell adult es produeixen dos mecanismes fortament involucrats en la plasticitat, la potenciació a llarg termini (long term potentiation, LTP) o la depressió a llarg temps (long term depression, LTD). Els dos processos són importants per la memòria i l'aprenentatge i s'han vist afectats en malalties psiquiàtriques i neurodegeneratives, com per exemple l'esquizofrènia o l'Alzheimer (Castillo, 2012; Sala and Segal, 2014).

A nivell molecular, la LTP es basa en canvis en la sinapsis que permeten incrementar els potencials postsinàptics. Aquests canvis faciliten la transmissió entre neurones i la generació dels potencial d'acció, i es produeixen tant a la membrana presinàptica com en la postsinàptica. Existeixen dos tipus de potenciació: la primerenca (early-LTP, E-LTP) i la tardana (late-LTP, L-LTP).

En l'E-LTP, es produeix canvis en la sinapsis però no implica síntesi proteica. La facilitació per incrementar el potencial postsinàptic desapareix de forma progressiva.

En el L-LTP, es produeixen canvis estructurals que impliquen la síntesi proteica *de novo*. Els canvis poden donar lloc fins i tot a la generació d'una nova sinapsis entre les neurones involucrades. Aquesta potenciació es produeix per una estimulació continuada de la sinapsis deguda a un increment de l'alliberació de neurotransmissors. La facilitat per incrementar el potencial postsinàptic es manté al llarg del temps.

Per altra banda, la LTD es basa en canvis en la sinapsis que dificulten la generació de potencials d'acció. Aquest procés pot donar lloc a la desaparició de la sinapsis.

### 5.1.1 Estructura de l'espina en plasticitat

La plasticitat postsinàptica es basa en canvis en l'estructura de l'espina. Aquests canvis afecten els potencials que es generen, incrementant-los o disminuint-los. Així doncs, aquests canvis es veuen reflectits en modificacions en la forma de l'espina, el coll de l'espina i els receptors.

Les diferents proteïnes involucrades en l'estructura i plasticitat de l'espina es poden agrupar en les següents categories (Sala and Segal, 2014):

- **Proteïnes d'unió al citoesquelet d'actina:** Les proteïnes associades a actina modifiquen l'espinoesquelet, la qual cosa implica canvis en la plasticitat de l'espina. D'aquesta manera, s'ha observat la implicació de proteïnes associades a les

dinàmiques d'actina; com per exemple les proteïnes d'encaputxament (CP o VASP), les proteïnes de ramificació (Arp2/3) o les de nucleació (WAVE 1 o WAVE 3); proteïnes motores associades actina, com les miosines; o proteïnes associades a la unió d'actina i la densitat postsinàptica, com la família de proteïnes Abi.

- **Proteïnes d'interacció del citoesquelet de microtúbuls i d'actina:** El citoesquelet de microtúbuls ajuda a la l'estabilització i potenciació de l'espina. En aquest sentit, són necessàries les proteïnes de interacció amb el citoesquelet d'actina com Map1B o Map2.
- **Proteïnes associades a l'activitat de les petites GTPases:** La família de les petites GTPases controlen la polimerització de l'actina. D'aquesta manera, les diferents senyals intracel·lulars i extracel·lulars controlen l'activitat d'aquestes proteïnes i les seves proteïnes associades, com GEFs o GAPs. Així doncs, trobem un ampli ventall de molècules involucrades en la plasticitat neuronal a través del control de l'activitat de les petites GTPases.
- **Molècules d'adhesió, matriu extracel·lular i receptors:** La majoria de proteïnes d'adhesió que tenen una funció en desenvolupament dendrític també tenen una funció en la formació i plasticitat sinàptica, com per exemple Neuroligin 1 i 3, involucrats en la formació de les connexions hipocampals i la plasticitat dendrítica. Les proteïnes de matriu extracel·lular també estan involucrades en el procés de plasticitat neuronal, com la glicoproteïna Reelina (Pujadas et al., 2010). D'altra banda, s'ha demostrat que les molècules de guia axonal també participen en la plasticitat sinàptica. Aquesta acció la realitzen a través dels seus receptors, que modulen el tamany de les espines. És el cas, per exemple, del receptor de Nogo-1 (Akbik et al., 2013)
- **Cinases:** Diferents cinases s'activen a través de receptors amb activitat tirosina cinasa, com per exemple les cinases PI3K o la cinasa d'adhesió focal (Focal adhesion kinase, FAK). Aquestes cinases controlen a través de la seva activitat la plasticitat de l'espina degut a la modificació de múltiples vies de senyalització.
- **Proteïnes de la PSD:** La PSD és una regió on es concentren diferents proteïnes necessàries per a la remodelació de l'espina. S'agrupen proteïnes de membrana, receptors, proteïnes reguladores del citoesquelet i proteïnes del citoesquelet. En el procés de plasticitat es produeixen canvis en aquesta estructura.
- **Factors de transcripció i proteïnes d'unió a ARNm:** La transcripció local de ARNm en les espines o dendrites és un mecanisme específic d'aportació de noves proteïnes per facilitar la remodelació i la plasticitat sinàptica. En aquest procés estan implicades proteïnes que participen en el transport de ARNm i la transcripció, com per exemple el factor de transcripció eEF1A2 (Abbott et al., 2009).
- **Receptors i canals iònics:** són l'element clau en la plasticitat sinàptica. El tipus i el nombre de receptors que estan a la membrana condicionen el canvi de potencial que es genera a l'espina.

El procés de plasticitat sinàptica engloba una ampla varietat de proteïnes i diversos mecanismes. L'objectiu és modular l'estructura sinàptica per adaptar-la a les senyals que rep.

### 5.1.2 Potenciació a llarg termini (LTP)

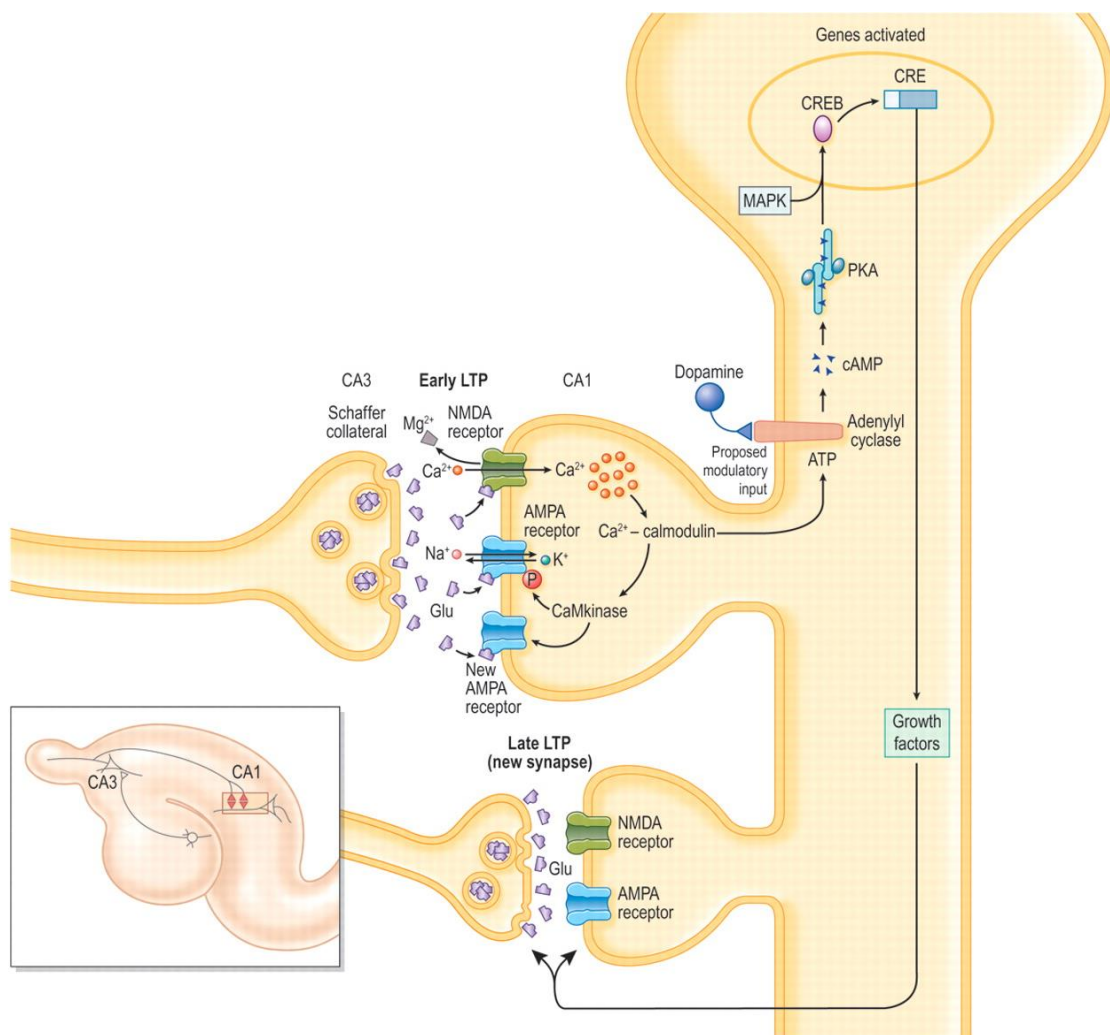
La potenciació a llarg temps és un mecanisme essencial per les funcions cognitives. És un mecanisme estructural que reflecteix l'aprenentatge i la memorització de noves tasques o nous aprenentatges tant sensorials com cognitius. Els canvis que es produeixen en la sinapsis contribueixen a incrementar la diferència de potencial a l'espina.

De forma resumida, el conjunts de successos que faciliten la potenciació a nivell postsinàptic són els següents (**figura I.5.1**) (Colgan and Yasuda, 2014):

- 1. Increment de la concentració de calci intracel·lular:** En condicions basals, els receptors de NMDA es troben bloquejats. D'aquesta manera, els canvis de potencial es produeixen per l'acció dels receptors AMPA. Quan es produeix una estimulació continuada en el temps tenim un major canvi de potencial, que produeix l'activació dels receptors de NMDA. Aquesta activació incrementa la concentració de calci intracel·lular.
- 2. Activació transitòria dels complexos dependents de  $Ca^{+2}$ /CaM:** Quan es produeix l'increment de calci es forma el complex  $Ca^{+2}$ /CaM, que provoca l'activació de diferents complexos i proteïnes, com CaMKII i la proteïna cinasa C (protein kinase C, PKC). En cervell adult el complex CaMKII està format per la combinació de les subunitats CaMKII $\alpha$  i CaMKII $\beta$ , en total hi ha 12 subunitats al complex CaMKII. L'activació del complex produeix la seva unió a la densitat postsinàptica.
- 3. Remodelació de la densitat postsinàptica:** L'activació de CaMKII produeix una desestabilització del citoesquelet d'actina. Aquesta desestabilització té lloc a través de la fosforilació de diverses proteïnes involucrades en l'estabilitat de la PSD, com Shank i PSD-95. A més a més, es produeix l'activació de diferents vies de senyalització que condueixen a la reestructuració del citoesquelet d'actina. Així doncs, totes les proteïnes involucrades en les dinàmiques d'actina són claus en aquest procés.
- 4. Incorporació de receptors AMPA a la membrana postsinàptica:** CaMKII i PKC produeix que els receptors que estaven agrupats a la PSD s'incorporin a la membrana. Aquesta incorporació és el mecanisme principal de potenciació de la sinapsis; com més receptors estan exposats a la membrana més canvi de potencial. Aquest increment de la diferència de potencial facilita l'obertura dels receptors NMDA.
- 5. Incorporació de proteïna específica en l'espina:** Els canvis estructurals impliquen la incorporació de proteïnes a través de dos mecanismes: canvis en l'endocitosi i l'exocitosi, i increment del tràfic de vesícules a l'interior de l'espina.
- 6. Penetració del citoesquelet de microtúbuls:** Els canvis originats en les dinàmiques d'actina també es transmeten fins al coll de l'espina, on les proteïnes del citoesquelet d'actina poden interaccionar amb els microtúbuls. És el cas, per exemple, de Map2, Map1A i Drebrina. Aquesta interacció produeix la polimerització dels microtúbuls a l'interior de l'espina. El citoesquelet de microtúbuls proporciona una estructura per a la nova incorporació de proteïnes. Així doncs, es produeix un increment del transport de vesícules que depenen de proteïnes motores del citoesquelet de microtúbuls (Dent, 2017)

Existeixen dos tipus de potenciació, la E-LTP i la L-LTP. Els dos tipus coincideixen amb els 6 primers mecanismes descrits. En el cas de la L-LTP es produeix una incorporació específica de proteïna a la sinapsis a través de la transcripció. Els dos mecanismes addicionals són:

7. **Transcripció específica en dendrites:** L'increment de calci produeix la transcripció específica en espina. A les dendrites s'ha identificat diferents ARNm de proteïnes necessàries per a la PSD i la remodelació de l'espina. Cal destacar la transcripció la cinasa PKM $\zeta$ . Aquesta cinasa és una isoforma de PKC constitutivament activa que facilita la translocació dels receptors AMPA a membrana.
8. **Activació de l'enzim adenilat ciclasa i de la transcripció nuclear:** Un increment prolongat de calci produeix l'activació de l'adenilat ciclasa, que genera AMPc. AMPc activa PKA i la MAPK. Posteriorment, es produeix una translocació de MAPK al nucli, on fosforila CREB. Aquesta fosforilació produeix la seva activació i el conseqüent inici de la transcripció de proteïnes necessàries per a la modificació de l'espina dendrítica. La potenciació tardana pot originar l'aparició de noves sinapsis.



**Figura 1.5.1. Esquema representatiu dels diferents mecanismes postsinàptics involucrats en la LTP.** Existeixen 2 tipus de LTP, la E-LTP i la L-LTP. En la E-LTP, es produeix una remodelació de l'estructura de l'espina. A més a més, en la L-LTP es produeix una transcripció proteica que ajuda a la modificació de l'espina. Adaptat de (Kandel et al ,2000)



### 5.1.3 Depressió a llarg temps (LTD)

El mecanisme oposat a la potenciació a llarg temps és la depressió a llarg temps, en la qual es produeix una disminució del potencial que es genera en l'espina. Aquesta reducció es produeix per canvis en l'espina que impliquen la reducció de tamany o la internalització dels receptors. A diferència del que es podria pensar pel fet de reduir el tamany d'espina o fins i tot desaparèixer, els processos de LTD són molt importants en la memòria i l'aprenentatge.

El procés de LTD es pot induir a través de la prolongació en el temps d'estimulacions de baixa freqüència (low-frequency stimulation, LFS) o per la plasticitat depenent de la freqüència dels impulsos (spike-timing dependent plasticity, STDP).

S'han descrit dos mecanismes en hipocamp que són necessaris per l'aprenentatge i la memòria (Collingridge et al., 2010):

- **El LTD depenent dels receptors de NMDA:** L'increment de calci produeix l'activació de CaM, que a diferència dels processos de LTP, activa la proteïna fosfatasa 1 (protein phosphatase 1, PP1) clau en el procés de LTD. PP1 activa GSK3 $\beta$  que desfosforila diferents proteïnes, com per exemple la subunitat del receptor AMPA GluA1 o la PSD-95. A més a més, l'increment de calci produeix la internalització dels receptors de AMPA i la reducció de l'activitat de polimerització de l'actina. Aquesta reducció produeix una desestabilització de l'estructura.
- **El LTD depenent dels receptors metabotrópic de glutamat:** La unió de glutamat al seu receptor metabotrópic produeix l'activació de la fosfolipasa específica de fosfoinositol C (phosphoinositide-specific phospholipase C, PLC) i l'increment de calci. Aquest increment és degut a l'acció de IP<sub>3</sub> en el reticle endoplasmàtic. L'activació de CaM modula la transcripció de proteïnes específiques per la LTD com són MAP1B o Arc. Aquestes molècules faciliten la internalització dels receptors AMPA.

### 5.1.4 Plasticitat presinàptica

A nivell biològic per modificar una sinapsis s'ha de remodelar tant el terminal presinàptic com el postsinàptic, regulant l'alliberació i l'efecte dels neurotransmissors. La remodelació del terminal presinàptic es va descriure posteriorment als processos de plasticitat postsinàptics. Les primeres evidències de la plasticitat presinàptica van ser en estudis de la connexió de les fibres molsoses a la CA3 (Zalutsky and Nicoll, 1990).

Les fibres molsoses presenten diferents tipus de plasticitat presinàptica, fenòmens de potenciació o de depressió. Tots ells es basen en la modificació del terminal presinàptic, produint canvis que afecten a l'alliberació del neurotransmissor. La potenciació produeix canvis per facilitar l'augment de l'alliberació de neurotransmissor. La depressió, en canvi, produeix una disminució de l'alliberació (**figura I.5.2**) (Castillo, 2012; Yang and Calakos, 2013).

Les fibres molsoses presenten dos mecanismes majoritaris de LTP: el mecanisme independent de receptors NMDA i el mecanisme depenent de cAMP/PKA. En els dos casos, es produeix un increment de calci en el terminal presinàptic. Aquest increment és causat per l'activació de diferents canals de calci o per l'alliberació citoplasmàtica de les reserves intracel·lulars. En la membrana presinàptica trobem diferents canals de calci, com per exemple els VGCCs. Aquest augment de calci produeix l'activació de PKA.

A més a més, en altres regions del cervell s'han observat processos de plasticitat sinàptica dependents de receptors NMDA, com per exemple en el còrtex. Aquests receptors també es

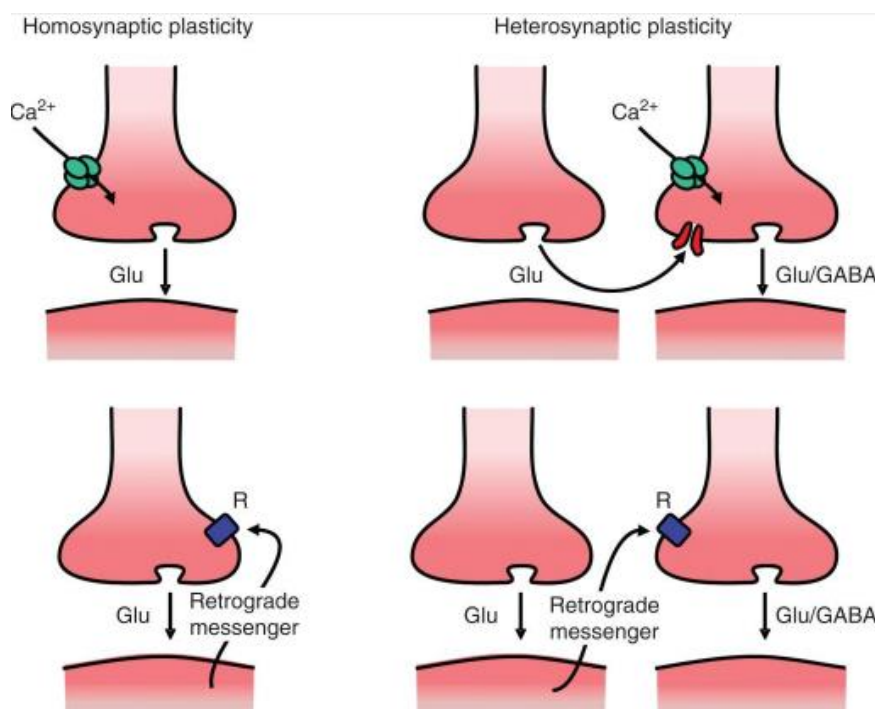
localitzen en el terminal presinàptic i produeixen un increment de calci (Rodríguez-Moreno et al., 2010).

Per altra banda, els processos de LTD en el terminal postsinàptic produeixen una disminució de l'activitat de cAMP/PKA. En aquest sentit, s'ha vist involucrat el receptor metabotròpic de glutamat mGluR2/3 (Castillo, 2012).

Un altre mecanisme en els processos de plasticitat presinàptica és la influència retrògrada del terminal postsinàptic. Aquesta influència és deu a l'acció de molècules que es sintetitzen al terminal postsinàptic i es difonen fins al presinàptic, on realitzen l'acció. S'ha descrit un ampli ventall de molècules amb aquesta característica: lípids, gasos, pèptids o factors de creixement (Regehr et al., 2009). La funció d'aquestes molècules es basa en els canvis de la concentració de calci presinàptic (Castillo et al., 2011).

Els processos de plasticitat presinàptica es basen en els canvis de l'activitat en PKA. Aquests canvis afecten a l'estructura de la zona activa, on es produeix la unió de les vesícules amb neurotransmissors. En concret, aquesta zona és rica en proteïnes que controlen el procés d'acostament, fusió i recirculació de les vesícules. PKA modifica l'activitat de la proteïna reguladora de l'exocitosi en membranes sinàptica 1 $\alpha$  (Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1, RIM1 $\alpha$ ). Aquesta proteïna conté múltiples dominis d'interacció i es troba enriquida en la zona activa on modula la neurotransmissió (Castillo et al., 2002).

Així doncs, en processos de LTP l'augment de l'activitat de PKA incrementa els nivells de fosforilació i l'activació de RIM1 $\alpha$ . En canvi, en processos de LTD es disminueix l'activitat de PKA, que redueix l'activitat de RIM1  $\alpha$ .



**Figura 1.5.2. Esquema representatiu dels diferents mecanismes involucrats en la plasticitat presinàptica.**

Els canvis en el terminal presinàptic es basen en el increment de calci. Aquest increment es pot produir per l'acció de canals de calci o per molècules que es sintetitzen a la zona postsinàptica. Els mecanismes de plasticitat poden ser homosinàptics o heterosinàptics. Adaptat de (Castillo, 2012)

## 5.2 Neurogènesi adulta

L'aprenentatge i l'adaptació a les senyals externes a través de la plasticitat neuronal no només es basa en la modificació de les sinapsis. A nivell neurobiològic el cervell ha desenvolupat un mecanisme a través del qual incorpora noves neurones. Les seves noves connexions faciliten l'aprenentatge. Aquest procés de generació i integració de noves neurones en cervell adult, s'anomena neurogènesi adulta.

La neurogènesi adulta s'ha identificat en diferents regnes animals, incloent mamífers i en humans (Bergmann et al., 2015). S'ha hipotetitzat que el motiu pel qual es produeix una neurogènesi adulta és la necessitat d'adaptació i integració de les noves senyals externes (Sahay et al., 2011).

S'ha detectat dues zones en les que es produeix neurogènesi adulta en condicions basals: la zona ventricular-subventricular (ventricular-subventricular zone, V- SVZ) i la zona subgranular del gir dentat (subgranular zone, SGZ) (Georg Kuhn and Blomgren, 2011). Hi ha altres zones, com el còrtex i l'estriat, que poden presentar neurogènesi en situacions patològiques (Gould, 2007).

### 5.2.1 Neurogènesi adulta en la SGZ

La neurogènesi en la zona subgranular del gir dentat va ser descrita en murins per Joseph Altman (Altman and Das, 1965). Aquesta neurogènesi genera noves neurones granulars que s'integren a la capa granular i projecten els axons a la zona de la CA3. Els axons formen part de les fibres molsoses. La generació i integració d'aquestes noves neurones és clau per les funcions cognitives. Les neurones del gir dentat generades en la neurogènesi adulta suposen un 30% del total del gir dentat (Ninkovic et al., 2007).

La neurogènesi adulta presenta molts paral·lelismes amb la neurogènesi embrionària. En concret, els progenitors neuronals que donen lloc a la formació del gir dentat durant el desenvolupament són els mateixos que generen les neurones en la neurogènesi adulta (Laplagne et al., 2006). En general, els factors de transcripció que regulen la neurogènesi embrionària i adulta són els mateixos. Pel contrari, la velocitat de maduració i les senyals externes que modulen la neurogènesi adulta difereixen de l'embrionària (Deng et al., 2010).

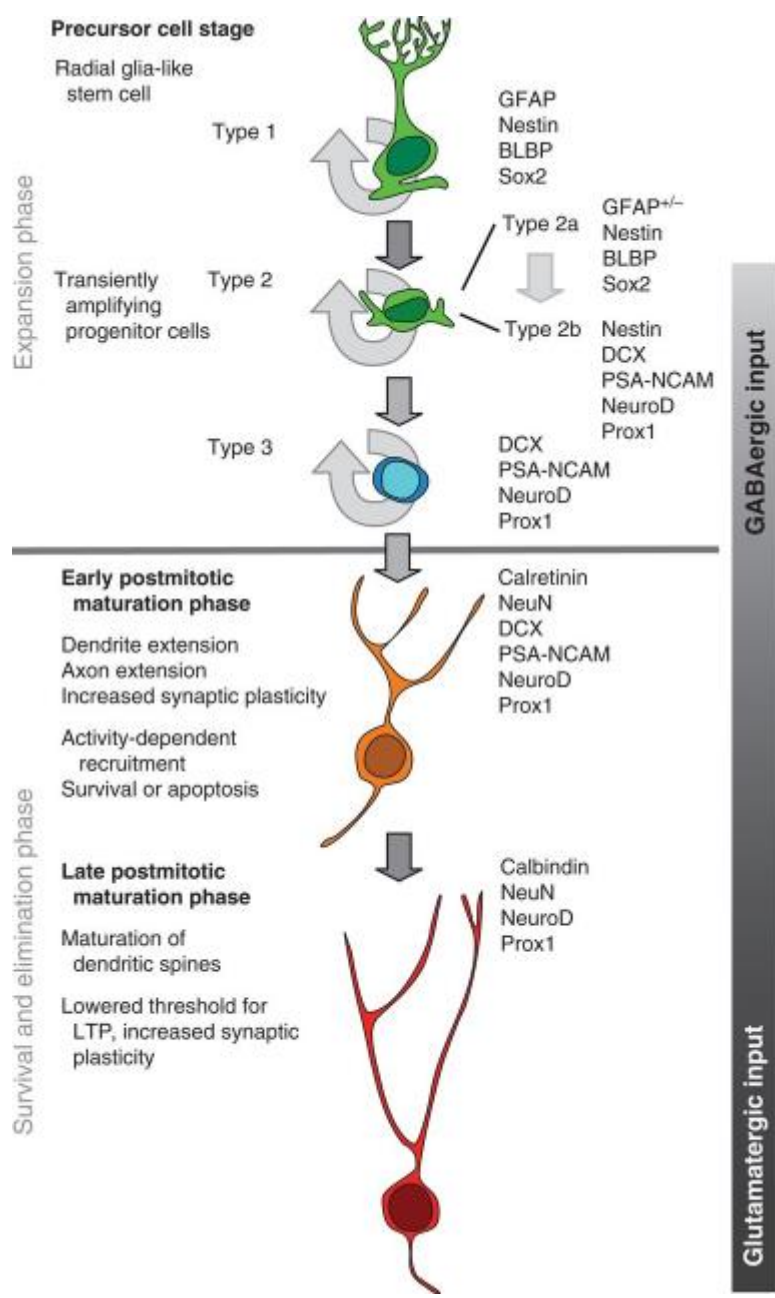
Per tal que es produeixi el procés de neurogènesi, la zona subgranular de l'hipocamp presenta un microambient òptim per la generació de noves neurones. En aquest ambient trobem diferents tipus cel·lulars: els progenitors neuronals, els progenitors intermedis, cèl·lules de la glia, micròglia i macròfags. Tots aquests tipus cel·lulars estan integrats en una matriu extracel·lular pròxima a una membrana vascular, ja que el sistema circulatori juga un paper en la regulació de la neurogènesi (Kempermann et al., 2015; Palmer et al., 2000).

La neurogènesi adulta en la SGZ s'ha classificat en 4 estadis, segons la bibliografia (**figura I.5.3**). En aquestes fases hi ha diferents tipus cel·lulars segons l'estadi de desenvolupament i maduració que expressen diferents tipus de marcadors neuronals (Kempermann et al., 2015).

#### 5.2.1.1 Estadi de proliferació

Les cèl·lules mare responsables de la neurogènesi adulta són una població de progenitors localitzats a la SGZ amb característiques morfològiques i marcadors característics de la glia radial: els progenitors de tipus 1. El nucli es localitza en la SGZ i estenen unes prolongacions a l'interior de la capa granular (Seri et al., 2001). Aquests progenitors tenen marcadors de la proteïna àcida fibril·lar glial (glial-fibrillary acidic protein, GFAP), el factor de transcripció de la

regió determinant del sexe caixa-Y (Sex determining region Y-box, SOX2) i Nestin. Els progenitors de tipus 1 es poden dividir de forma simètrica o asimètrica (Kempermann et al., 2015). Com a fruit de la divisió asimètrica es forma un progenitor intermedi: progenitor de tipus 2. Aquests cèl·lules de tipus 2 es classifiquen en dos subtipus: 2a i 2b. Els progenitors de tipus 2a presenten una elevada taxa de divisió i marcadors de glia radial, però a diferència dels progenitors de tipus 1, no presenten les mateixes característiques morfològiques. Degut a canvis en l'expressió de factors de transcripció les cèl·lules de tipus 2a evolucionen a 2b. Els progenitors intermedis de tipus 2b expressen factors del llinatge neuronal, com Prox1 i Trb2. Els progenitors de tipus 2b originen els progenitors de tipus 3. Aquest tipus de progenitors tenen una taxa de divisió baixa en condicions normals, i els seus marcadors neuronals són DCX i la molècula d'adhesió cel·lular neuronal polisialitzada (polysialyted neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM). En condicions patològiques es produeix un increment de la taxa de divisió d'aquest tipus de progenitors.



**Figura 1.5.3. Esquema representatiu dels diferents estadis de la neurogènesi adulta en la SGZ.**

La neurogènesi adulta es divideix en 4 estadis: proliferació, supervivència, maduració postmitòtica i maduració tardana.

Hi ha diferents tipus cel·lulars que expressen marcadors característics en els diferents estadis.

El tipus de neurotransmissió també canvia al llarg de la diferenciació neuronal. Adaptat de (Kempermann et al., 2015)

La transició i expansió dels diferents tipus de progenitors està regulada per múltiples factors:

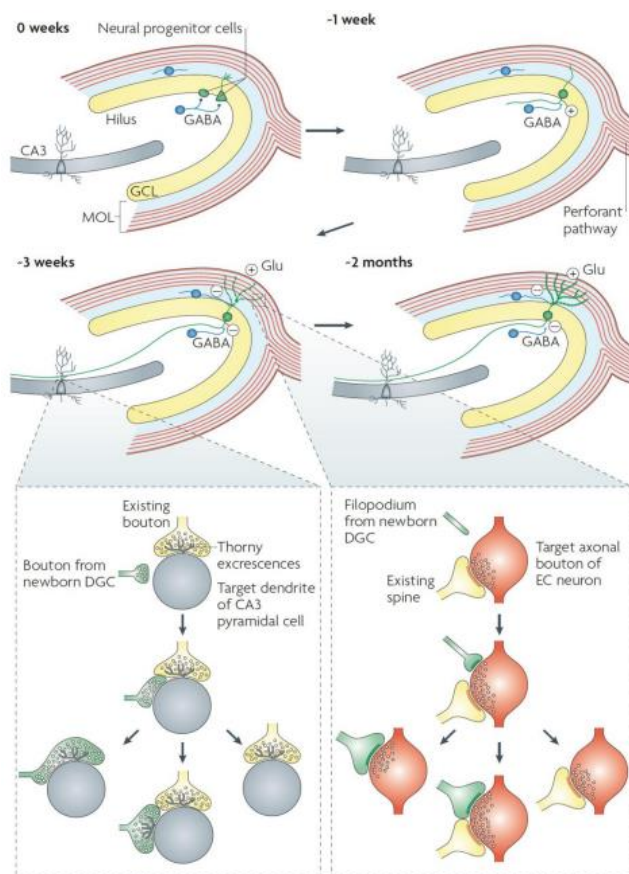
- **Factors de transcripció:** l'expressió de factors de transcripció regula la transició entre diferents tipus subcel·lulars. Trb2, per exemple, actua de supressor de l'expressió de SOX2. En aquest sentit, els nivells de SOX2 són claus en la transició de progenitor a progenitor intermedi. A més a més, l'expressió de Tlx controla l'expressió dels factors de transcripció NeuroD1 i Prox1, característics del llinatge neuronal. (Beckervordersandforth et al., 2015).
- **Activitat neuronal:** Els progenitors de tipus 1 i 2 expressen receptors de GABA. D'aquesta manera, els diferents tipus neuronals responen a l'activitat generada per aquests receptors GABA. L'activitat induïda controla, per exemple, la taxa de divisió dels progenitors de tipus 1. (Kempermann et al., 2015).  
En aquest sentit, la SGZ rep projeccions de diferents regions del cervell, com fibres dopaminèrgiques procedents de l'àrea tegmental ventral o colinèrgiques del septum. Així doncs, els diferents neurotransmissors regulen l'activitat dels progenitors i controlen la neurogènesi adulta (Marin-Burgin et al., 2012).
- **Astròcits:** Els astròcits localitzats a les zones de neurogènesi juguen un paper clau en el control d'aquesta a través de factors que secreten (Song et al., 2002).
- **Factors ambientals:** es coneixen diferents factors ambientals que regulen la neurogènesi. L'exercici físic o les dietes riques amb polifenols augmenten la taxa de divisió dels progenitors de tipus 1. L'estrés i l'edat produeixen l'efecte contrari (Aimone et al., 2014)

### **5.2.1.2 Fase de supervivència neuronal**

Les neurones postmitòtiques primerenques expressen marcadors neuronals com Calretinin i NeuN. El nombre de neurones noves positives per NeuN decau de forma dramàtica al llarg de les 2 primeres setmanes. Aquest efecte es deu a l'eliminació de les neurones abans que realitzin connexions funcionals a la CA3 i rebin senyals del còrtex entorínic. Majoritàriament les neurones que sobreviuen les 2 primeres setmanes s'integren al circuit hipocampal. D'aquesta manera només les neurones correctament integrades sobreviuen.

Les neurones generades expressen proteïnes necessàries per desenvolupar l'axó i formar l'arbre dendrític. A nivell axonal s'expressen proteïnes presents en el desenvolupament, com la isoforma de tau embrionària. Part de la plasticitat axonal que caracteritza les fibres molles depèn de les noves connexions realitzades per aquestes neurones. En aquest estadi de supervivència, el neurotransmissor GABA produeix funcions excitatòries en les noves neurones. A mesura que es desenvolupa, la nova neurona ha d'adaptar tota l'estructura postsinàptica a la senyal glutamatèrgica (Ge et al., 2006). Així doncs, el canvi de GABA a funcions inhibidòries no es produeix fins que no hi ha suficients contactes glutamatèrgics.

S'han descrit diferents factors associats a la supervivència neuronal, com els factors neurotròfics o l'activitat neuronal. En concret, el percentatge de supervivència està associat amb l'aprenentatge del circuit hipocampal. Per tant, la incorporació de noves neurones al circuit és necessària per tal de poder assimilar noves senyals externes (Toni and Schinder, 2015).



**Figura I.5.4. Esquema representatiu de la integració de la nova neurona al circuit existent.**

Inicialment la neurona generada rep senyals excitatòries GABAèrgiques. A mesura que desenvolupa tota l'estructura neuronal també es formen les estructures postsinàptiques i presinàptiques, que permeten la integració de les senyals glutamatèrgiques i es produeix un canvi respecte les propietats electrofisiològiques. La senyal GABAèrgica es transforma en inhibidòria.

Les noves neurones han de realitzar contactes i projeccions en els circuits existents el grau de plasticitat de les estructures en formació és clau per adaptar-se als circuits existents. En aquest procés es produeix una competència amb els contactes existents que es poden ser desplaçats o substituïts. Adaptat de (Deng et al., 2010)

### 5.2.1.3 Maduració postmitòtica

Igual que en el desenvolupament del cervell, en la neurogènesi adulta es produeix un procés de sinaptogènesi i maduració de la neurona per tal que aquesta s'adapti i s'integri al circuit existent (**figura I.5.4**) (Deng et al., 2010). La integració al circuit neuronal és seqüencial. Primer es produeix una elongació de l'axó i desenvolupament del terminal axonal. D'aquesta manera, les fibres molles formen connexions a la CA3 al voltant dels 10 dies després de la generació de la neurona. Una setmana més tard té lloc la formació de les espines. En aquest sentit, les senyals GABAèrgiques són necessàries per la formació de les sinapsis glutamatèrgiques. A partir de la tercera setmana es produeixen els canvis en les senyals excitatòries: la nova neurona rep senyals excitatòries glutamatèrgiques a través de la via perforant i les senyals GABAèrgiques es converteixen en inhibidòries. Igual que en el desenvolupament, la formació i refinament de les noves connexions són dependents de l'activitat. Tanmateix, es produeix una competència entre les connexions existents i les que es formen. (Deng et al., 2010; Kempermann et al., 2015).

### 5.2.1.4 Maduració tardana

A mesura que la nova neurona sobreviu i s'integra en els nous circuits comença a expressar marcadors neuronals madurs, com el canvi de Calretinin a Calbindin, i canvia les seves propietats electrofisiològiques. Aquests canvis produeixen que les noves neurones s'assemblin a les existents prèviament.

Igual que en el desenvolupament, la nova neurona té una fase d'elevada plasticitat sinàptica, propietat que disminueix amb el pas del temps. Aquesta fase té lloc entre les 4 i les 6 setmanes després a la generació de la neurona. Els processos de LTP són molt freqüents en aquestes neurones: de fet, la majoria de processos de LTP mesurables en gir dentat provenen d'elles. Aquesta elevada plasticitat ajuda a la consolidació de les noves memòries temporals a la memòria a llarg temps, mecanisme que es produeix a través de la integració de les noves

neurones amb major plasticitat. Entre les 6-8 setmanes posteriors a la generació de la neurona, aquesta està totalment integrada i madura al circuit (Kempermann et al., 2015).

## 5.2.2 Neurogènesi adulta en la V-SVZ

En la majoria de mamífers es produeix una incorporació constant de noves neurones al bulb olfatori. Aquestes neurones provenen de la neurogènesi en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) dels ventricles laterals del cervell, regió que manté una estructura semblant a la VZ i la SVZ embrionària. La neurogènesi adulta genera noves neurones que migren de forma rostral fins a la zona del bulb olfatori, on es diferencien i s'integren.

La neurogènesi en la V-SVZ ha estat àmpliament estudiada degut a l'accessibilitat de la zona, la taxa de divisió dels progenitors i la robustesa dels cultius *in vitro* dels progenitors (Lim and Alvarez-Buylla, 2016).

### 5.2.2.1 Tipus cel·lulars

Els progenitors neuronals que trobem a la V-SVZ s'anomenen cèl·lules B1 i presenten moltes característiques de cèl·lules glials (Garcia-Verdugo et al., 1998). Aquestes cèl·lules provenen de divisions de la glia radial en estadis postnatals primerencs. Es poden identificar amb la combinació de diferents marcadors, com GFAP, el transportador glutamant-aspartat (glutamate aspartate transporter, GLAST) o la proteïna d'unió a lípids del cervell (brain lipid-binding protein, BLBP) (Kempermann et al., 2015).

Les cèl·lules B1 poden estar actives o en estadi quiescent. En l'estadi actiu es divideixen i donen lloc als progenitors intermedis de divisió ràpida, cèl·lules tipus C. Les divisions de les cèl·lules B1 poden ser asimètriques, generant una cèl·lula de tipus B1 i una de tipus C. Els marcadors característics de les cèl·lules C són els factors de transcripció *Ascl1* i *Dlx2*. Aquestes cèl·lules tipus C es divideixen i generen els neuroblast, cèl·lules de tipus A. Les cèl·lules de tipus A expressen *DCX* i *PSA-NCAM*. Els neuroblast generats a la V-SVZ migren a la zona del bulb olfactiv, formant la via migratòria rostral (Doetsch et al., 1997).

En condicions normals, les cèl·lules de tipus C es divideixen de forma simètrica tres vegades, i les cèl·lules A dues vegades en la V-SVZ o durant la migració (Ponti et al., 2013).

Les cèl·lules B1 també poden dividir-se per donar lloc a cèl·lules que no són del llinatge neuronal, com oligodendròcits i astròcits. En condicions patològiques les cèl·lules B1 poden generar neurones que migren a la regió on hi ha la lesió. (Benner et al., 2013).

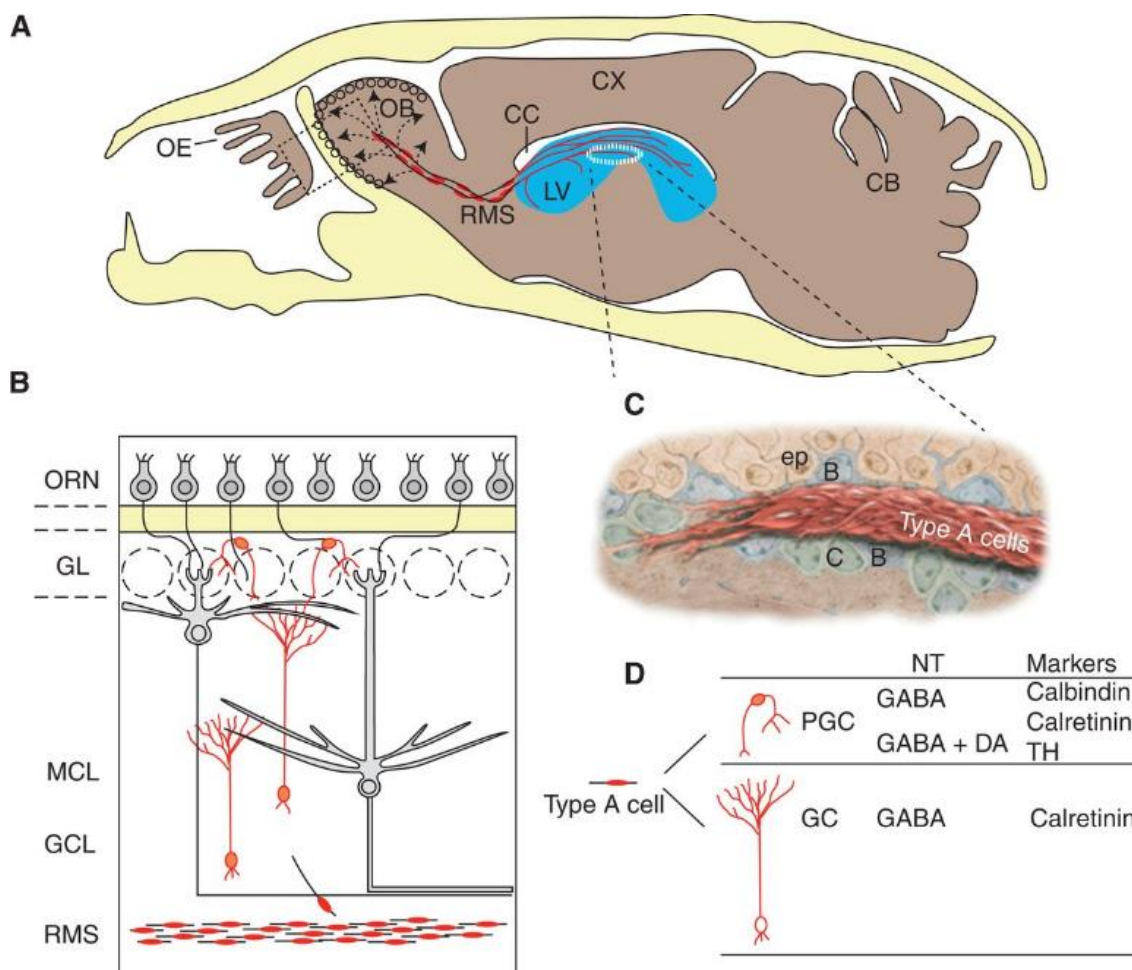
Les cèl·lules de tipus B1 són una població heterogènia a nivell de factors de transcripció al llarg de l'eix anteroposterior i dorsoventral. Degut a la influència en la divisió dels diferents factors de transcripció, es generen sis subtipus cel·lulars d'interneurones del bulb olfatori, 3 subtipus de cèl·lules periglomerular (periglomerular cells, PGC) i tres subtipus de cèl·lules granulars (granule cells, GC).

La majoria de neurones que es generen amb la neurogènesi adulta en el ventricle són cèl·lules granulars. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per no presentar axó, tenen dos tipus de dendrites, apicals i basals. Les dendrites apicals presenten un segment proximal no ramificat i un segment distal ramificat. El fragment proximal rep contactes sinàptics glutamatèrgics. El segment distal presenta espines bidireccionals que formen les sinapsis dendo-dendrítiques. Aquestes sinapsis bidireccionals dendo-dendrítiques reben glutamat i alliberen GABA, que té un efecte inhibitori local. Les GC només alliberen GABA en aquestes dendrites (Kelsch et al., 2010).

### 5.2.2.2 Factors que influeixen la neurogènesi en V-SVZ

Igual que en la neurogènesi en la SGZ, la zona de V-SVZ també està molt influenciada per l'entorn. L'entorn genera un nínxol específic que conté diferents senyals extracel·lulars que condicionen les cèl·lules B1, C i A.

El nínxol conté factors del líquid cefaloraquídi i del sistema endotelial dels vasos sanguinis que innerven la V-SVZ. Les cèl·lules B1 contacten directament amb el líquid cefaloraquídi i amb les cèl·lules endotelials a través d'un cili i una prolongació, respectivament. Al voltant dels vasos sanguinis trobem diferents tipus cel·lulars: cèl·lules endotelials, fibroblasts i macròfags. El vasos sanguinis també tenen un matriu extracel·lular característica amb Laminina i Col·lagen. D'aquesta manera, la taxa de divisió i diferenciació de les diferents cèl·lules del nínxol estan condicionades pels diferents factors, tals com citoquines, factors de creixement (EGF o FGF), morfògens (BMP o Shh) , neurotransmissors (GABA, serotonina, dopamina o glutamat) i senyals endotelials (factor de creixement de l'endoteli vascular (vascular endothelial growth factor, VEGF) o el factor derivat del pigment epitelial (Pigment epithelium-derived factor, DEDF)) (Kempermann et al., 2015).



**Figura 1.5.5. Esquema representatiu de la neurogènesi en la V-SVZ i la incorporació de les noves neurones al bulb olfatori (OB).** A) Secció sagital del crani del ratolí on es mostra la regió V-SVZ de color blau. Les noves neurones es marquen de color vermell, es representa la via migratòria rostral a través de la qual les noves neurones s'integren al bulb olfatori. B) Les neurones que es generen a la V-SVZ donen lloc a interneurons periglomerulars (PGC) o interneurons granulars (GC), de color vermell. C) Els diferents tipus cel·lulars presents a la V-SVZ. D) Els diferents marcadors que presenten les interneurons GC i PGC. Adaptat de (Lim and Alvarez-Buylla, 2016)



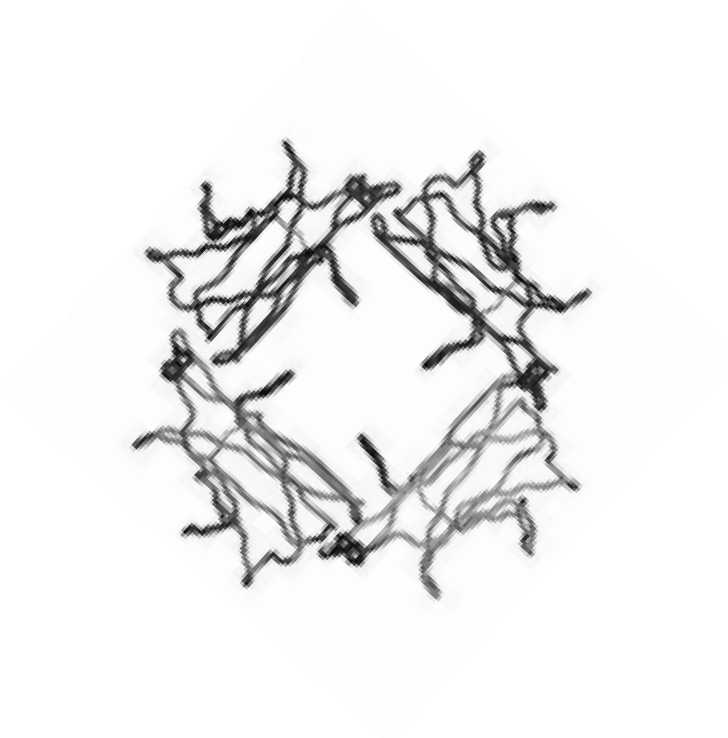
### 5.2.2.3 Estadis de maduració

El procés de neurogènesi de V-SVZ dura unes 4 setmanes. Igual que en SGZ, les neurones generades tenen un procés de maduració i integració al circuit existent. També es produeix el canvi a nivell de neurotransmissió, de GABA a glutamat. Aquest procés de maduració s'ha dividit en 5 estadis, descrits a continuació (Kelsch et al., 2010; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002):

1. **Migració tangencial** (entre els 2-7 dies després de la generació de la nova neurona): les cèl·lules de tipus A migren formant la via migratòria rostral fins al bulb olfatori. A nivell electrofisiològic expressen receptors GABA i AMPA.
2. **Migració radial** (entre els 5-7 dies posterior a la generació de la nova neurona): la neurona comença formar les primeres dendrites per les capes profundes del bulb olfatori. A nivell electrofisiològic comença a expressar els receptors de glutamat.
3. **Creixement dendrític** (entre 9-13 dies després de la generació de la nova neurona): té lloc el creixement dendrític. Aquest desenvolupament dendrític no passa la capa de cèl·lules mitrals. A nivell electrofisiològic comença a rebre els primers contactes inhibitoris procedents de les fibres centrífugues i mitrals.
4. **Formació de les primeres sinapsis excitatòries** (entre 11-22 dies després de la generació de la nova neurona). Comença la maduració funcional de la neurona. La neurona presenta una morfologia dendrítica madura i comença a rebre sinapsis excitadores. La neurona no ha desenvolupat espines però té sinapsis al segment proximal de la dendrita apical.
5. **Maduració i integració definitiva** (entre 15-30 dies després de la generació de la nova neurona): a les regions més distals de la dendrita apical es formen la majoria d'espines i sinapsis funcionals.

Només un percentatge de neurones generades a la V-SVZ s'integren i sobreviuen. Igual que en les neurones generades en la SGZ, aquesta integració és depenent d'activitat. La integració al sistema preexistent es produeix de manera seqüencial: primer desenvolupen l'estructura postsinàptica en la zona proximal, per rebre les connexions glutamatèrgiques, i posteriorment desenvolupen les estructures dendo-dendrítiques.

## **6. Molècules d'adhesió. Implicacions i funcions en neurobiologia**



Les molècules d'adhesió modulen la formació i estabilització de les sinapsis i la formació dels circuits neuronals. Cada neurona expressa una combinació específica de proteïnes d'adhesió que permet un reconeixement molecular específic.

Les neurones presenten una gran varietat de proteïnes de membranes involucrades en múltiples processos durant el desenvolupament, el manteniment de l'estructura i la remodelació neuronal. Aquestes proteïnes actuen d'enllaç entre l'espai extracel·lular i l'espai intracel·lular. Al llarg de la tesi hem vist la implicació de diferents proteïnes de la membrana, com receptors, molècules d'adhesió o proteïnes de senyalització ancorades a la membrana. En aquest capítol veurem una visió general de les proteïnes d'adhesió involucrades en diferents processos, des del desenvolupament fins al manteniment i remodelació de les sinapsis.

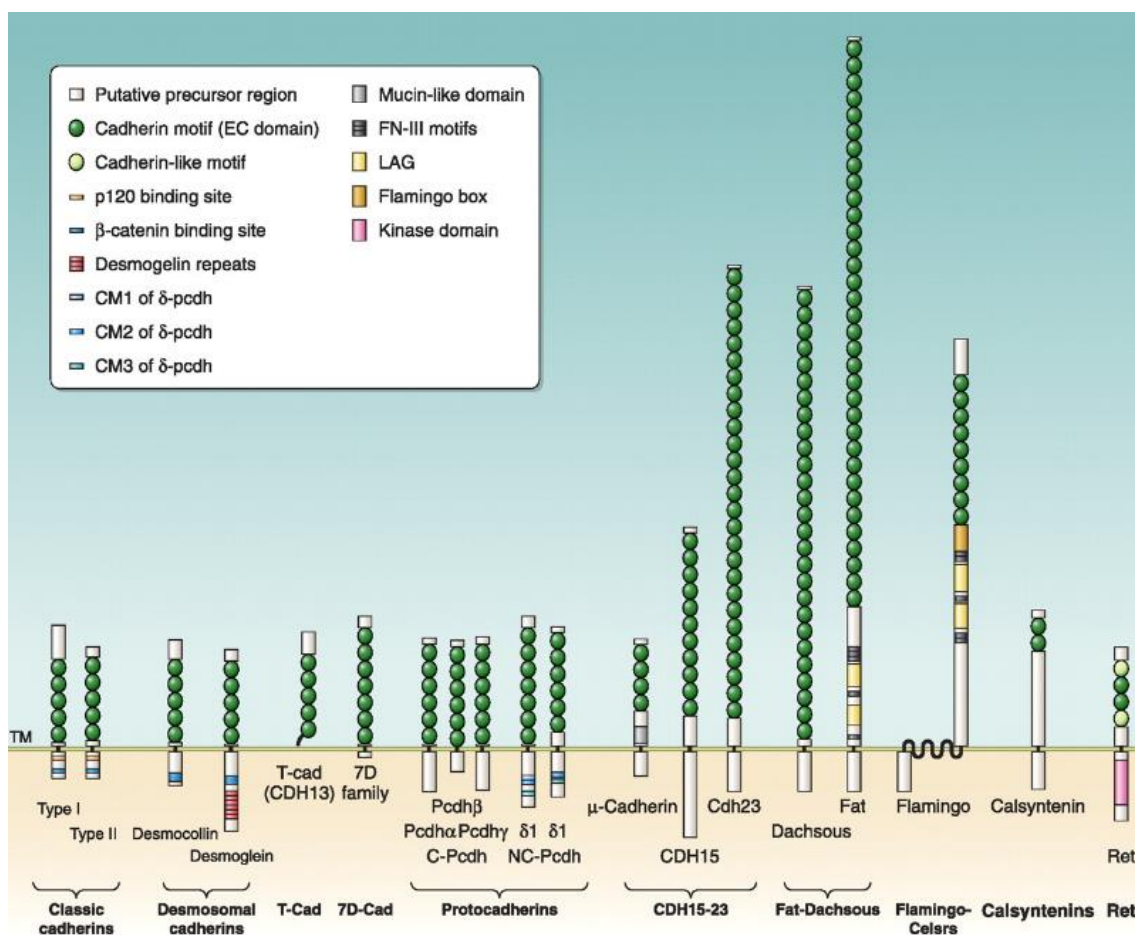
El grup de les molècules d'adhesió cel·lular (cell adhesion molecules, CAMs) inclou més de 200 proteïnes, fins el moment. Les molècules incloses en aquest grup participen en la interacció de la cèl·lula amb la matriu extracel·lular o en la interacció cèl·lula-cèl·lula. Aquestes funcions es basen en la propietat de realitzar unions homofílques o heterofílques. Les molècules d'adhesió es classifiquen en 4 famílies (Shapiro et al., 2007): les cadherines, la superfamília de molècules d'adhesió de immunoglobulines (immunoglobulin superfamily, IgSF), les integrines i les neurexins/neuroligins. Hi ha una àmplia varietat estructural de CAMs que reflecteix la diversitat funcional d'aquestes proteïnes.

Les CAMs participen en: senyalització cel·lular (Hansen et al., 2008; Shima et al., 2007), remodelació del citoesquelet (Maness and Schachner, 2007) i expressió genètica (Kleene et al., 2010). Les proteïnes CAMs estan associades en l'estructuració laminar del cervell i la formació de sinapsis específiques en aquestes estructures (Baier, 2013; Huberman et al., 2010). Hi ha diferents estudis genòmics que relacionen les proteïnes d'adhesió amb patologies psiquiàtriques com l'autisme, l'esquizofrènia o retards mentals (Baig et al., 2017; Schmid and Maness, 2008; Zhang et al., 2015). Aquestes patologies presenten connexions aberrants dels circuits neuronals (Tost et al., 2012). Les diferents funcions que realitzen les CAMs fan que aquestes siguin molècules diana d'estudi en aquestes patologies per intentar explicar la desconexió dels circuits (Missaire and Hindges, 2015).

## 6.1 Cadherines

Al genoma humà trobem codificades 115 membres de la família de les cadherines. Es tracta de proteïnes transmembrana que presenten diferents dominis extracel·lulars de Cadherina (**figura I.6.1**). Les cadherines són proteïnes d'adhesió cel·lular dependents de calci, que poden realitzar unions *cis* o *trans*. Les unions en *cis* són unions a proteïnes adjacents en la mateixa membrana. Les unions en *trans*, en canvi, són unions entre proteïnes que es troben a la membrana oposada. La família de les cadherines està subdividida en: les cadherines clàssiques, les protocadherines, Flamingo/Celsr, FAT i calsyntenin.

Les cadherines tenen múltiples funcions a nivell neuronal, des de la neurogenèsi i formació del cervell, fins a l'establiment de sinapsis i regulació de la plasticitat en cervell adult. Les més estudiades són les cadherines clàssiques.



Esquema I.6.1. Esquema dels diferents membres de la família de les cadherines.

La família de les cadherines presenten un domini extracel·lular amb diferents dominis cadherines. Adaptat de (Hirano and Takeichi, 2012).

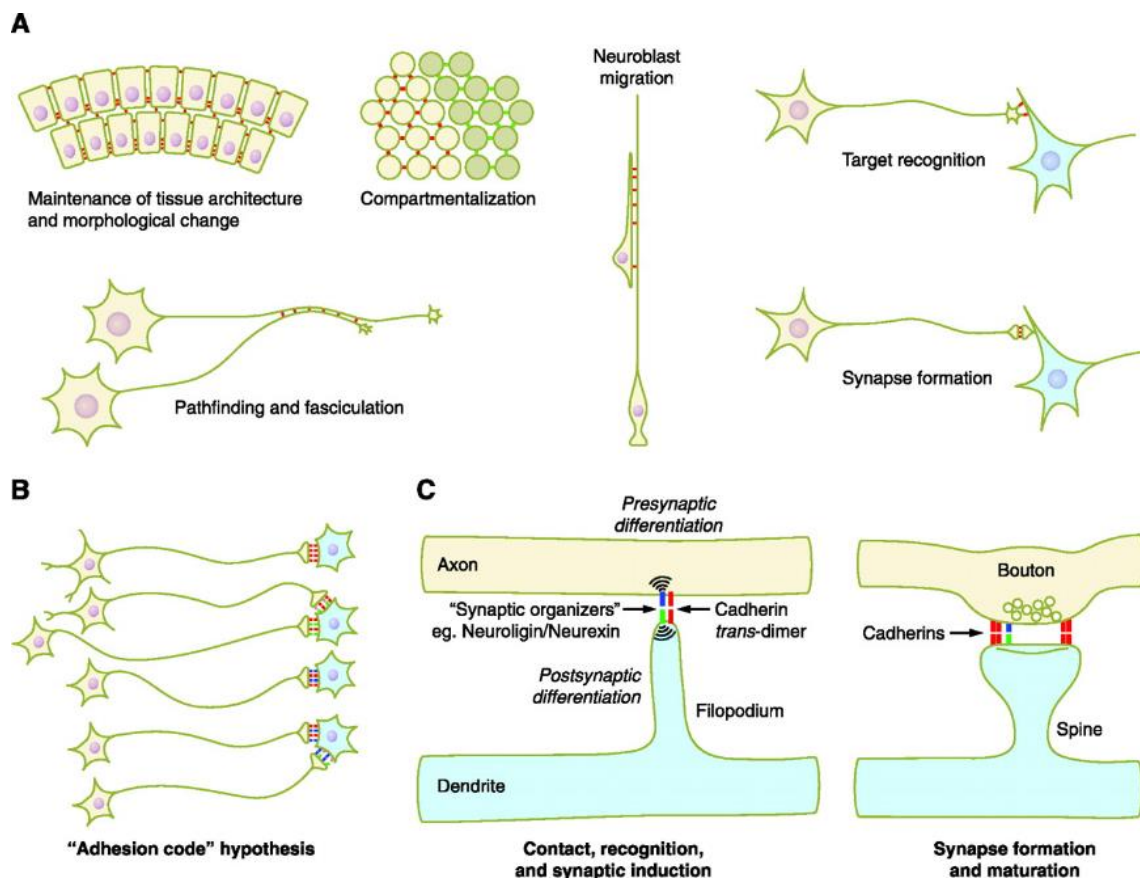
### 6.1.1 Cadherines clàssiques

Les cadherines clàssiques estan presents des d'estadis embrionaris fins a cervell adult (Takeichi, 1988). Són proteïnes transmembranes amb una regió extracel·lular que conté 5 dominis cadherina. A nivell intracel·lular, interaccionen amb diferents proteïnes del citosol a través de la cua citoplasmàtica. La família més important d'interactors són les catenines,  $\alpha$ ,  $\beta$  i p120. Aquestes proteïnes controlen diferents processos (Hirano and Takeichi, 2012): dinàmiques del citoesquelet d'actina i microtúbuls, la via de senyalització de Wnt, la via de les Rho GTPases o processos de transcripció. La unió de les cadherines amb el citoesquelet forma les unions adherents. Es tracta d'estructures dinàmiques del citoesquelet en les quals les cadherines juguen un paper fonamental en el control. En aquest sentit, les sinapsis són unions adherents específiques del sistema nerviós (Takai et al., 2008).

Les cadherines clàssiques participen a través de les seves interaccions en molts processos neuronals (Hirano and Takeichi, 2012) (**figura I.6.2**):

- **Formació del tub neural i formació del neuroepiteli:** les cadherines són indispensables per la compartimentalització del tub neural i per la formació del neuroepiteli. Dèficits en N-cadherina o la  $\alpha$ -catenina suposen errors en la formació dels neuroepitelis, per exemple, de l'hipocamp i del cerebel.

- **Migració neuronal:** la cadherines són essencials en diferents tipus de migració durant el desenvolupament neuronal. L'exemple més conegut és la N-cadherina en la migració radial. En el model de dins-fora controlat per la Reelina, l'efecte d'aquesta molècula en el reciclatge de N-cadherina provoca la disminució de N-cadherina en la membrana. Aquest fet produeix la translocació somal terminal de la neurona, que permet el seu òptim posicionament en la capa cortical.
- **Elongació de les neurites i ramificació:** les cadherines participen en l'elongació de les neurites *in vivo* i *in vitro*, a través de la regulació del citoesquelet d'actina al con de creixement. En hipocamp s'ha vist que les cadherines regulen la ramificació dels axons de les fibres molsoses.
- **Fasciculació:** la fasciculació és un mecanisme a través del qual els axons s'uneixen a tractes axonals previs per tal d'arribar a la regió diana. Les cadherines participen en aquests processos de fasciculació. El dèficit de cadherines ocasiona defectes en els tractes axonals comissurals.



Esquema 1.6.2. Esquema dels diferents processos en els quals intervien les cadherines clàssiques.

Les cadherines clàssiques participen en múltiples processos durant el desenvolupament neuronal: la compartimentalització del tub neural, la migració, el reconeixement específic i la sinaptogènesi. Adaptat de (Hirano and Takeichi, 2012).

- **Reconeixement de la cèl·lula diana i sinaptogènesi:** les cadherines participen en els processos de reconeixement molecular en els axons i les espines. Això permet la reorganització del citoesquelet per formar les estructures presinàptiques i postsinàptiques. Les neurones expressen diferents subtipus de cadherines. Aquest ventall de proteïnes permet la formació de sinapsis específica degut al reconeixement molecular. Les cadherines també controlen la morfologia de l'espina degut a la seva acció sobre el citoesquelet d'actina i les proteïnes que regulen les dinàmiques d'actina. Diferents exemples en pollastre i mosca demostren la implicació de les cadherines en aquest reconeixement específic (Redies et al., 2003).
- **Plasticitat sinàptica:** l'activitat neuronal produeix processos de plasticitat a través de diferents mecanismes dependents de cadherines que incrementen el nombre de sinapsis i augmenten el volum i la forma d'aquestes.

Les cadherines participen en molts processos neurals. D'aquesta manera, la seva pèrdua s'ha relacionat amb diferents patologies neuronals, com el retard mental o l'autisme (Hirano and Takeichi, 2012).

### 6.1.2 Cadherines no clàssiques

Hi ha diferents famílies incloses a les cadherines no clàssiques: les protocadherines, Flamingo/Celsr, FAT i calsynenin.

Cal destacar les protocadherines, que inclouen 64 tipus de cadherines dels aproximadament 115 que formen el total de la família de les cadherines.

Les protocadherines realitzen unions amb elles mateixes. S'ha hipotetitzat que el ventall de protocadherines que pot expressar una neurona permet la diversitat de connexions (Yagi, 2008). Algunes protocadherines participen en la formació de les projeccions axonals entre diferents regions del cervell, com la protocadherina 10. D'altra banda, s'ha detectat una gran varietat de protocadherines en sinapsis i participant en processos de sinaptogènesi, manteniment de l'estructura sinàptica i sinaptogènesi, com la CNRs o Arcadlin (Hirano and Takeichi, 2012).

La família Celsr/fFlamingo són cadherines involucrades en el tancament del tub neural, la migració neuronal durant el desenvolupament i la projecció dels tractes axonals. A nivell de la morfogènesi neuronal, aquesta família de proteïnes controla el creixement i la ramificació dendrítica i la guia axonal (Boutin et al., 2012).

La família FAT està formada per un conjunt de cadherines poc estudiades. Es coneix que alguns membres participen en el desenvolupament neuronal a través de la interacció amb el citoesquelet d'actina, on participen en la formació de lamel·lipodis (Tanoue and Takeichi, 2004).

Les proteïnes de la família calsynenin són abundants en la membrana postsinàptica de les neurones adultes, on controlen el tràfic vesicular i la formació de la memòria (Hoerndli et al., 2009)

## 6.2. Integrines

Les integrines són una família de receptors d'adhesió superficial de la cèl·lula que interaccionen amb la matriu extracel·lular. Les integrines formen heterodímers entre una subunitat  $\alpha$  i una de  $\beta$ . En total hi ha 24 possibles combinacions de les diferents subunitats codificades en mamífers. La unió dels lligands a les integrines provoca un canvi conformacional que produeix una modificació dels adaptadors intracel·lulars, com Talin o Vinculin, i una activació de diferents vies de senyalització que promouen el dinamisme del citoesquelet d'actina i l'activació de cinases claus en l'adhesió focal, com per exemple l'activació de la proteïna FAK.

Les integrines participen en diferents processos neuronals (Park and Goda, 2016):

- **Migració i corticogènesi:** les integrines s'expressen en les neurones corticals durant el desenvolupament i participen en la migració neuronal a través de la interacció amb Reelina i la glia radial. Aquestes proteïnes permeten la unió i migració de les neurones a través de la glia radial: quan les neurones contacten amb la Reelina a través de les integrines, es produeix la desunió de les neurones de la glia radial. S'ha observat que la pèrdua de la subunitat  $\beta 1$  produeix el posicionament invertit de les capes corticals, fenotip semblant al que presenta l'animal deficient de Reelina (Chai and Frotscher, 2016)
- **Morfogènesi neuronal:** les integrines promouen el creixement dendrític i axonal. Faciliten la projecció axonal i el reconeixement de la regió diana. També presenten funcions associades a la interacció amb factors de creixement i proteïnes de la matriu extracel·lular, que a través de les integrines activen les vies de senyalització de MAPK i les Rho GTPases.
- **Sinaptogènesi i manteniment de la sinapsis:** Posteriorment al reconeixement de la regió diana, les integrines també participen en el procés de formació de sinapsis. Interaccionen amb diferents mecanismes o estructures de la sinapsis, com el tràfic vesicular de transmissors, el posicionament dels receptors AMPA i NMDA i les dinàmiques del citoesquelet d'actina. A més a més, les integrines modulen la sinapsis a través d'altres interaccions amb la glia i la matriu extracel·lular.
- **Plasticitat sinàptica:** Degut a la funció que realitzen en el manteniment de les sinapsis, les integrines també participen en processos de plasticitat, tant en LTP com en LTD. S'ha vist que el bloqueig de la seva funció, amb anticossos o el dèficit d'algunes subunitats de les integrines, perjudica els processos de potenciació o depressió. Aquesta funció recau en la regulació dels receptors de NMDA en la membrana.

Les integrines igual que altres molècules d'adhesió s'han associat a diferents patologies neuronals. L'animal deficient la subunitat  $\beta 3$ , per exemple, presenta problemes de comportament associats a l'autisme (Carter et al., 2011). Per altra banda, els dèficits de memòria i sinàptics observats en models d'Alzheimer estan associats a l'efecte de l'amiloide  $\beta$  sobre l'activitat de les integrines (Wang et al., 2008).

### 6.3 Neurexins/Neuroligins

Les neurexins són proteïnes transmembrana que participen en l'adhesió cel·lular. En mamífers, hi ha 3 gens que codifiquen per aquestes proteïnes, però degut als empalmaments alternatius es generen múltiples transcrits. Aquest fet produeix una àmplia varietat d'isoformes. De forma general, les neurexins estan ancorades a la membrana presinàptica, on realitzen funcions imprescindibles per la neurotransmissió. Les neurexins participen en unions intercel·lulars a través de la unió amb neuroligins. Les neuroligins són proteïnes transmembrana, codificades en 4 gens. Estan expressades en el cervell i es localitzen a la membrana postsinàptica. La unió entre neurexins i neuroligins és dependent de calci i essencial per la formació i el manteniment de sinapsis (Reissner et al., 2013).

La unió entre neurexins i neuroligins participa en la formació del cervell. Aquesta unió intercel·lular entre les membranes presinàptiques i postsinàptiques és clau per la sinaptogènesi. Durant els estadis inicials de la sinaptogènesi, la unió entre neurexins i neuroligins estableix el fil·lopodi que donarà lloc a la formació de l'espina postsinàptica. Aquesta estabilització es produeix a través de les neuroligins.

Posteriorment a l'estabilització de l'espina es produeix l'agrupament de les proteïnes necessàries per la sinapsis. En aquest sentit, les neurexins i les neuroligins interaccionen amb la proteïna cinasa de serina dependent de calci/calmodulina (calcium/calmodulin dependent serine protein kinase, CASK) i la proteïna PSD-95 respectivament. Aquestes interaccions faciliten la formació de la sinapsis. S'ha observat que la sobreexpressió de neurexins que es troba a la zona presinàptica produeix l'agrupació de la proteïna PSD-95 a la membrana postsinàptica i la sobreexpressió de neuroligins produeix l'agrupació de marcadors presinàptics. El procés de sinaptogènesi regulat per les neurexins i les neuroligins és necessari tant per les sinapsis inhibidores com les excitatòries (Krueger et al., 2012; Shapiro et al., 2007). La unió entre neurexins i neuroligins participa en processos de potenciació i depressió de les sinapsis. Aquesta unió en les sinapsis madures és dependent de l'activitat. Per exemple, un augment de l'activitat incrementa la quantitat de neuroligins al terminal postsinàptic amb la consegüent remodelació de la sinapsis (Krueger et al., 2012).

A nivell patològic, s'ha relacionat les mutacions puntuals en els gens que codifiquen per les neurexins i les neuroligins en l'autisme (Reissner et al., 2013).



## 6. 4 Proteïnes d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines

Les proteïnes d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines representen una de les famílies més antigues i més diversificades de les proteïnes d'adhesió. Generalment, aquestes proteïnes presenten un domini extracel·lular amb diferents dominis immunoglobulina i fibronectina, un domini transmembrana i una cua citosòlica a través de la qual interaccionen amb el citosol. Diferents empalmaments alternatius produeixen isoformes ancorades a la membrana a través d'una unió a glicosilfosfatidilinositol (GPI) o isoformes solubles. Aquestes proteïnes realitzen les funcions d'adhesió a través dels dominis immunoglobulina N-terminal. En aquest sentit, s'ha vist que poden realitzar unions homofíliques o heterofíliques. La majoria de proteïnes d'aquesta superfamília participen en processos d'unió neuronal. Dins d'aquesta superfamília trobem diferents subfamílies de proteïnes: L1CAM, Contactines, DSCAM o NCAM.

### 6.4.1 Subfamília L1CAM

La subfamília de L1CAM conté en ratolí les següents proteïnes: L1CAM, CHL1, NrCAM i les neurofascines. Aquestes proteïnes participen en processos neuronals tant en desenvolupament com en cervell adult.

- **L1CAM:** Durant el desenvolupament controla la migració neuronal. El seu dèficit produeix errors en el posicionament i en l'expressió de factors de transcripció de les neurones corticals (Kishimoto et al., 2013).

A nivell de morfogènesi neuronal, L1CAM controla la formació i fasciculació dels axons i el creixement dendrític a través de diferents vies de senyalització, com les cinases MAPK i PI3K. L1CAM participa en l'elongació de les neurites a través d'un constant reciclatge en el con de creixement, procés facilitat per l'endocitosi.

Igual que les altres molècules d'adhesió, L1CAM també participa en el reconeixement de la regió diana dels axons. El seu dèficit produeix un desenvolupament aberrant dels tractes axonals corticocallosos i de les dendrites de les neurones corticals (Demyanenko et al., 1999).

L1CAM controla la formació de sinapsis. En *Drosophila* i *C.elegans*, L1CAM s'ha vist relacionat amb l'estructura necessària per l'alliberament de neurotransmissors, com les proteïnes unc-13 i rab3 (Opperman et al., 2015).

- **CHL1:** participa en la migració neuronal i el desenvolupament de neurites a través de la interacció amb la proteïna DISC, proteïna rellevant en la corticogènesi i el creixement neurític (Ren et al., 2016). Aquestes funcions produeixen que l'animal deficient de CHL1 presenti errors en la formació de les capes corticals, el desenvolupament de les dendrites de les neurones corticals i la formació de les projeccions de les fibres molsoses (Demyanenko et al., 2004).

A nivell sinàptic, CHL1 participa en l'organització del terminal presinàptic a través de l'unió al complex de xapareones que regulen el reciclatge de les vesícules (Leshchyns'ka et al., 2006). CHL1 actua de modulador del sistema serotoninèrgic a través de la regulació de la via de senyalització del receptor de serotonina 5-HT<sub>2c</sub> (Kleene et al., 2015).

- **NrCAM:** és una proteïna altament expressada en els axons, tant durant el desenvolupament com en la neurona madura. Participa en processos de creixement neurític, en mecanismes semblants a L1CAM i CHL1. En aquest sentit, es produeix un solapament de funcions i llocs d'expressió de diferents proteïnes de la família L1CAM amb NrCAM.

Per altra banda, NrCAM es localitza en els nodes de Ranvier conjuntament amb les neurofascines. L'animal deficient en aquesta proteïna presenta problemes en l'agrupació dels canals de sodi en els nodes de Ranvier i errors en la formació de projeccions comissurals (Katidou et al., 2008).

- **Neurofascines:** són proteïnes involucrades en el creixement neurític i en l'organització de la mielinització dels axons. La seva funció és clau per la formació dels nodes de Ranvier, ja que un dèficit de la proteïna produeix una desestructuració d'aquests nodes (Katidou et al., 2008).

#### 6.4.2 Contactines

El subgrup de contactines són proteïnes que presenten una unió tipus GPI. Aquest grup està format per 6 membres, fins el moment. Estructuralment, contenen 6 dominis immunoglobulina i 4 de fibronectina. Les contactines es troben involucrades en diferents processos en el desenvolupament neuronal. El seu dèficit s'ha associat a diferents patologies neuronals. Tots els membres d'aquest grup s'expressen en estadi postnatals, a més a més, TAG-1 (Contactina 2) s'expressa en estadis embrionaris (Katidou et al., 2008).

TAG-1 està involucrada en processos de migració, on s'ha vist que participa en la transició de MP a BP. D'aquesta manera, l'animal deficient de TAG-1 presenta problemes en aquesta transició i l'especificació axonal. A més a més, TAG-1 s'ha vist involucrada en processos de fasciculació i guia axonal. Cal recordar que TAG-1 és una proteïna ancorada a membrana que no presenta cua citosòlica. Així doncs, la seva funció es produeix a través de la interacció en *cis* amb proteïnes de membrana, com la família de les cinases Src, altres proteïnes d'adhesió (L1 o NrCam) o la proteïna CASPR2 (Namba et al., 2015).

Els altres membres de la família de les contactines presenten solapaments parcials en els patrons d'expressió i en les funcions. D'aquesta manera, s'ha vist que contactin1 s'expressa durant el desenvolupament i en cervell adult en diferents regions del cervell, com hipocamp i còrtex. En aquestes regions participa en l'axogènesi i la mielinització. També s'ha observat que participa en l'organització del Node de Ranvier. Per altra banda, contactin 3, 4, 5 i 6 també s'expressen en cerebel, bulb olfatori, còrtex auditiu i cerebel, respectivament, i participen en processos de desenvolupament de l'axó i formació de sinapsis (Shimoda and Watanabe, 2009).

### 6.4.3 DSCAMs

La molècula d'adhesió cel·lular del Síndrome de Down (Down Syndrome cell adhesion molecule, DSCAM) es localitza a la zona crítica del cromosoma 21. Aquesta regió està associada amb els fenotips neurològics característics del síndrome de Down. DSCAM va ser la primera proteïna identificada de la família de les DSCAMs. En vertebrats s'han identificat 2 membres d'aquesta família: DSCAM i DSCAML1. Aquestes proteïnes són transmembrana amb un fragment extracel·lular, que conté 10 dominis immunoglobulina i 6 dominis fibronectina, i un fragment intracel·lular (Zhu et al., 2011).

La funció de DSCAM s'ha caracteritzat en *Drosophila*, ja que presenta 38061 isoformes diferents. Aquestes isoformes provenen de 4 gens diferents amb múltiples empalmaments alternatius. Així doncs, cada neurona presenta una expressió concreta i específica de diferents isoformes de DSCAMs. S'ha hipotetitzat que aquesta combinació confereix una identitat molecular específica a cada neurona. Aquesta identitat és clau per la connexió i la formació de circuits (Jan and Jan, 2010). En concret, les diferents isoformes de DSCAMs realitzen unions homofíliques i les seves funcions són claus durant el desenvolupament i en cervell adult. Així doncs, participen en processos de morfogènesi neuronal, tant en el desenvolupament dendrític com axonal. A més a més, regula el reconeixement de la regió diana durant la sinaptogènesi. En cervell adult, les DSCAMs participen en la regulació de la sinapsis (Zhu et al., 2011).

En vertebrats, DSCAMs no presenta una varietat tant elevada de isoformes. Els dos gens identificats no presenten l'elevat nombre d'empalmaments alternatius descrits en mosques. Els estudis realitzats fins el moment associen menys funcions en vertebrats respecte les descrites en *Drosophila*. Tot i això, la família de DSCAM s'ha vist involucrada com a receptor de Netrina en guia axonal, i en la formació de l'arbre dendrític en neurones hipocampals (Zhu et al., 2011).

### 6.4.4 Molècules d'adhesió cel·lular neuronal (NCAMs): Ncam1

La família de les molècules d'adhesió cel·lular neuronal (Neural cell adhesion molecules, NCAMs) conté diferents proteïnes depenent de l'espècie. En el cas dels mamífers, hi ha dos gens que codifiquen per proteïnes d'aquesta família: *Ncam1* i *Ncam2*. Les dues proteïnes de la família presenten la mateixa estructura: una regió extracel·lular amb 5 dominis immunoglobulina i 2 dominis fibronectina; un domini transmembrana, i una cua citosòlica.

*Ncam1* va ser la primera molècula d'adhesió cel·lular detectada al sistema nerviós. Aquesta proteïna presenta diferents isoformes: la isoforma de 180KDa, *Ncam180*; la isoforma de 140KDa, *Ncam140*; i la isoforma de 120KDa, *Ncam120*. La isoforma *Ncam180* s'expressa majoritàriament en cervell adult. La isoforma *Ncam140* es detecta tant en estadis embrionaris com en cervell adult. La isoforma *Ncam120* s'expressa majoritàriament en la glia. Les diferents isoformes de *Ncam1* presenten un mateix domini extracel·lular. Per contra, l'empalmament alternatiu produeix diferències en els dominis transmembrana o citosòlics. La isoforma *Ncam120* es troba ancorada en membrana a través de GPI. Totes les isoformes presenten modificacions postraduccional al domini extracel·lular, la més important és la polisialització. Aquesta modificació postraduccional es basa en la unió de diverses còpies de l'àcid  $\alpha$  2,8 N-acetilneuramínic, conegut també com a àcid siàlic. Aquesta modificació és necessària per moltes funcions que realitza la proteïna *Ncam1*.

- **Desenvolupament:** Ncam1 és clau en el procés de migració i posicionament neuronal. Concretament, la polisialització de Ncam1 és essencial per aquests processos. L'animal deficient en els enzims responsables d'aquesta modificació presenten defectes en la migració i en l'expressió de factors de transcripció. Els nivells de polisialització de Ncam1 incrementen en estadis embrionaris, i en estadis postnatsals decauen de forma progressiva. Aquests nivells es mantenen en les regions de neurogènesi adulta, on Ncam1 és necessària per la migració i posicionament de les neurones (Angata et al., 2007).
- **Neuritogènesi, creixement axonal i dendrític:** Ncam1 és una proteïna que participa en el creixement neurític i la supervivència neuronal a través de diferents vies de senyalització (**figura I.6.3**). L'activació d'aquestes vies també depèn de la localització cel·lular de Ncam1. Ncam1 queda retinguda a través de la palmitoilació en dominis lipídics, com els *lipids rafts*. Cal destacar que aquesta proteïna activa mecanismes que promouen l'entrada de calci, necessària per l'activació de la transcripció, i l'activació de vies que modifiquen el citoesquelet, com la petita GTPasa Rac o la cinasa PKC (Maness and Schachner, 2007).

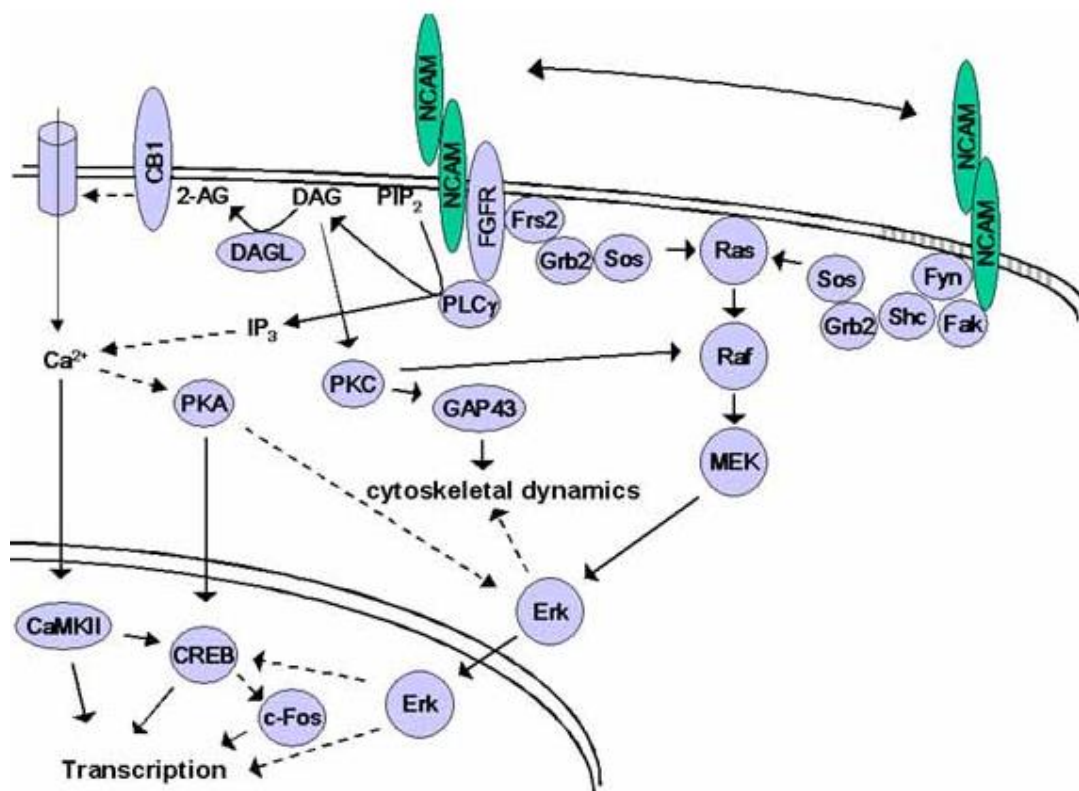


Figura I.6.3. Esquema representatiu de les vies de senyalització activades per Ncam1.

Diagrama que representa les diferents vies de senyalització que activa Ncam1 i promouen el creixement neurític i la supervivència neuronal. De forma general s'activen vies que promouen la modificació del citoesquelet i l'entrada de calci. Adaptat de (Hinsby et al., 2004).

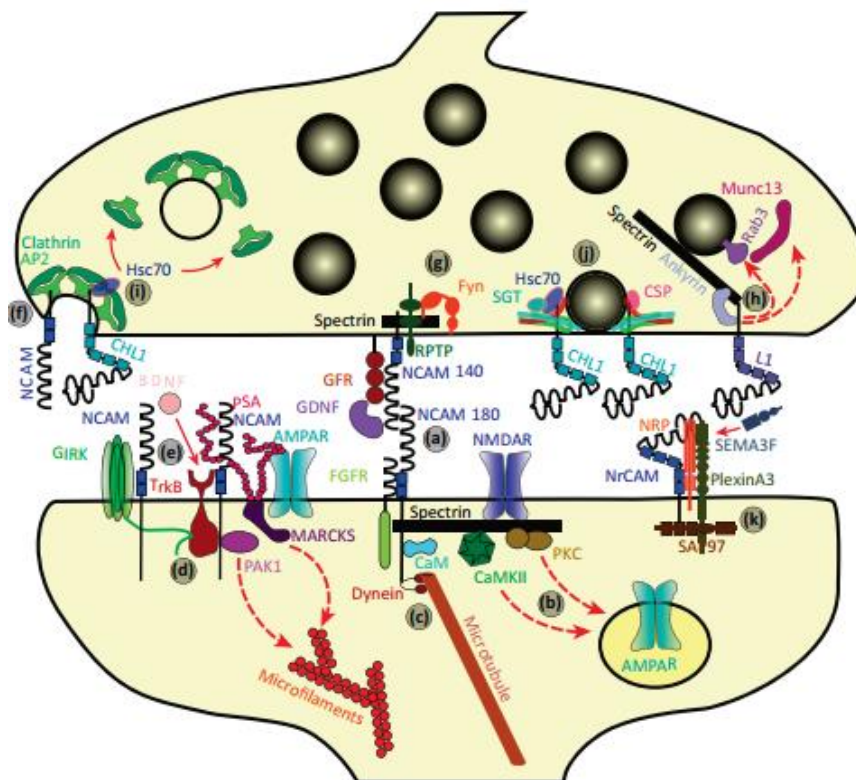
- **Sinaptogènesi:** Ncam1 és una de les primeres molècules que s'acumula en les sinapsis en formació i promou la unió entre membranes i la seva estabilització. Aquesta proteïna s'acumula a les sinapsis per dos mecanismes: el transport específic dependent de cinesina 1 i les modificacions postraduccional que produeixen aquest efecte. Ncam1 interacciona amb moltes proteïnes del citosol i de la membrana de les

sinapsis, tant en la regió presinàptica com postsinàptica. D'aquesta manera, la sobreexpressió de Ncam1 estimula la formació de sinapsis. El dèficit de Ncam1, en canvi, produeix una reducció del volum de les espines. (Sytnyk et al., 2017)

- **Manteniment de les sinapsis i plasticitat neuronal:** en neurones madures hi ha un aportació constant de Ncam1 a les sinapsis per mantenir la forma i estructura. En les sinapsis, Ncam1 interacciona amb diferents proteïnes del citoesquelet, senyalitzadores, de la matriu extracel·lular i altres proteïnes de la membrana (**figura I.6.4**). Es produeixen efectes sinèrgics sobre la plasticitat sinàptica degut a les unions heterofílques de Ncam1 amb altres proteïnes d'adhesió com les integrines, CHL1 o L1 tenen (Sytnyk et al., 2017).

Ncam1 està present en molts mecanismes que regulen les dinàmiques de la sinapsis: les vies de regulació del citoesquelet d'actina i els microtúbuls, la internalització dels receptors, el reciclatge de les vesícules de neurotransmissors, les vies activades per factors de creixement i les vies d'entrada de calci que regulen processos de potenciació o depressió de les sinapsis (**figura I.6.4**).

Ncam1 és, doncs, una proteïna que participa en molts processos neuronals. Les modificacions en els nivells de Ncam1 degut a múltiples factors genètics o ambientals estan associades a diferents patologies neuronals (Shaw et al., 2014; Zhang et al., 2014).



**Figura I.6.4.** Esquema representatiu de les vies de senyalització i mecanismes on Ncam1 es troba involucrada en la sinapsis madura.

Ncam1 està present diferents mecanismes que regulen les dinàmiques de la sinapsis: les vies de regulació del citoesquelet d'actina i els microtúbuls, la internalització dels receptors, el reciclatge de les vesícules de neurotransmissors i les vies activades per factors de creixement. Adaptat de (Sytnyk et al., 2017).

## 7. Molècula d'adhesió cel·lular neuronal 2 (Ncam2)



La combinació de moltes molècules d'adhesió confereix una identitat molecular a les neurones. Molt sovint no coneixem la funció específica i pressuposem que fan funcions redundants en molts casos.

La molècula d'adhesió cel·lular neuronal 2 (neural cell adhesion molecule 2, Ncam2), coneguda també com a molècula d'adhesió cel·lular olfactiva (OCAM) i molècula d'adhesió cel·lular neuronal Rb-8 (Rncam), és una glicoproteïna de la família de les molècules d'adhesió cel·lular (CAM) inclosa en la superfamília de les immunoglobulines. En mamífers, forma conjuntament amb la proteïna Ncam1 la família de les proteïnes de molècules d'adhesió molecular neuronal (Ncam).

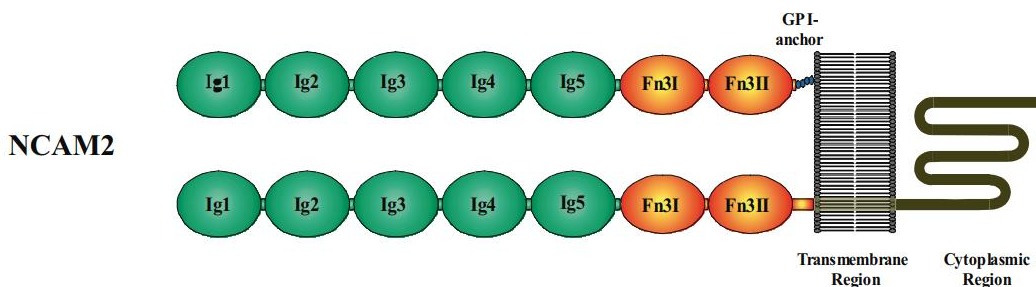
## 7.1 Gen NCAM2

El gen que codifica per Ncam2 apareix degut a la duplicació genètica de Ncam1, són gens paral·lels (Makino and McLysaght, 2010; Pebusque et al., 1998). En humans, el gen es localitza al cromosoma 21 (regió 21q21.1) i conté 25 exons. En ratolins és localitza el cromosoma 16 (16 C3.3) i conté 19 exons. Degut a un empalmament alternatiu es transcriuen 2 isoformes: Ncam2.1 i Ncam2.2. L'ARNm de Ncam2.1 conté un element d'estabilitat localitzat a 3'-UTR (Alenius and Bohm, 1997) de manera que l'ARNm de la isoforma Ncam2.2 es més inestable. Això provoca una menor expressió i que aquesta sigui més restringida temporalment en comparació a l'ARNm de la isoforma Ncam2.1 (Yoshihara et al., 1997).

Fins al moment coneixem que l'expressió genètica de Ncam2 es troba sota el control del factor de transcripció STAT5 (Nelson et al., 2006).

## 7.2 Proteïna

Les proteïnes de la família Ncam presenten el mateix ectodomini, format per 5 dominis immunoglobulina i 2 dominis de fibronectina III (Fn3). La isoforma Ncam2.1 de 837 aminoàcids, en ratolí, presenta un domini transmembrana i una cua citosòlica. La isoforma Ncam2.2 de 727 aminoàcids, en ratolí, està ancorada a membrana a través d'una unió a glicosilfosfatidilinositol (figura 1.5.1).



**Figura 1.5.1. Estructura de les isoformes de Ncam2.**

Ncam2 presenta 2 isoformes degut a un empalmament alternatiu (splicing alternatiu). La isoforma Ncam2.1 de 837 aminoàcids, en ratolí, presenta un domini transmembrana i una cua citosòlica. La isoforma Ncam2.2 de 727 aminoàcids, en ratolí, està ancorada a membrana a través d'una unió a glicosilfosfatidilinositol. La part extracel·lular comuna entre les dues isoformes presenta 5 dominis immunoglobulina i 2 dominis de fibronectina III (Fn3). Adaptat de (Kulahin and Walmod, 2010)

### 7.2.1 Dominis

La isoforma Ncam2.1 presenta una cua citosòlica amb diferents dominis: un domini homòleg de Src 2 i un 3 (Src homology domain 2 i 3, SH2 i SH3). Són dominis de interacció entre diferents proteïnes. En concret, moltes proteïnes amb aquests dominis estan involucrades en la senyalització cel·lular a través de l'activació de cinases de tirosina. Per exemple, el domini SH2 està present en la cinases Fyn i Lyn, el domini SH3 en les cinases PI3K i FAK.

La cua citosòlica és una seqüència PEST, rica amb prolines, àcid glutàmic, serines i treonines. Majoritàriament les proteïnes que presenten una seqüència PEST tenen una vida mitja curta (Rechsteiner and Rogers, 1996). En el cas de Ncam2, tot i tenir una seqüència PEST, no s'ha observat que aquesta afecti a la seva vida mitja, no presenta una ràpida degradació (Kulahin and Walmod, 2010).

### 7.2.2 Modificacions postraduccional

A nivell estructural i funcional la zona de més interès de Ncam2 és la cua citosòlica de la isoforma Ncam2.1. És el domini a través del qual pot interaccionar amb les proteïnes del citosol i on es podria donar lloc la transmissió de la senyals externes. S'han realitzat diferents estudis bioinformàtics sobre Ncam2 per tal de detectar possibles modificacions postraduccional. La seva homologia amb Ncam1 (un 45% en humans) i les funcions descrites per aquesta proteïna han ajudat a comprendre la seva possible funció. Les modificacions postraduccional descrites són(Kulahin and Walmod, 2010):

- **Palmitoilació:** La cua citosòlica conté 3 residus cisteïna que poden presentar aquesta modificació: C729, C734 i C740. La palmitoilació és clau en diferents proteïnes per agrupar-les en dominis *lipids rafts*.
- **Fosforilació:** S'han descrit 3 residus fosforilats en cervell de ratolí: S765, T780 i S786 (Huttlin et al., 2010). A part d'aquests residus, la cua citosòlica és una regió PEST rica en residus fosforilables, serines i treonines.
- **Tall:** Les dues isoformes presenten un tall entre els aminoàcids 682-701. Això produeix que s'alliberi el fragment extracel·lular.
- **Glicosilacions:** La part extracel·lular presenta 8 punts de N-glicosilació. Aquests punts són seqüències HNK-1, presents en moltes proteïnes d'adhesió cel·lular, com L1CAM o MAG. S'ha hipotetitzat que la funció d'aquestes seqüències i les glicosilacions seria facilitar la migració de les neurones de la cresta neural (Yu and Yanagisawa, 2006).

Tot i que Ncam2 presenta una homologia elevada amb Ncam1, hi ha molts dominis importants per la funció de Ncam1 que no estan presents en Ncam2. Aquest seria el cas dels dominis de polisialització o el domini d'unió a ATP (Kulahin and Walmod, 2010).

### 7.2.3 Interaccions

Les proteïnes CAM són proteïnes que modulen les senyals extracel·lulars i diferents vies de senyalització a través d'interaccions amb el domini extracel·lular i/o amb la cua citosòlica. En el cas de Ncam2, s'han realitzat pocs estudis d'interaccions. De moment es coneixen les següents interaccions:

- **Interaccions homofíliques:** S'ha demostrat que hi ha unions homofíliques amb el primer domini immunoglobulina de Ncam2. Aquesta unió facilita la interacció en *cis*, donant lloc a la dimerització, i *trans*, facilitant la unió entre cèl·lules (Kulahin et al., 2011).
- **Interaccions heterofíliques:** s'ha trobat alguna interacció amb alguna proteïna de la família de les 14-3-3 i la proteïna priònica (prion protein, Prp)(Collins et al., 2006; Kislinger et al., 2006). En neurones corticals s'ha observat la interacció amb c-Src (Sheng et al., 2015). En neurones hipocampals de models murins de la malaltia d'Alzheimer s'ha detectat la interacció amb A $\beta$  (Leshchyns'ka et al., 2015).



### 7.3 Expressió

Ncam2 s'expressa en diferents vertebrats i és present en tots els mamífers. Les seves isoformes es detecten en diferents teixits, però el cervell és el que presenta una major expressió respecte als altres teixits analitzats, com els testicles, el pulmó, el cor i el fetge (Paoloni-Giacobino et al., 1997). S'ha detectat ARNm en estadis embrionaris i adult. En el sistema nerviós central s'ha detectat en diferents regions, tals com amígdala, nucli caudal, cos callós, hipocamp, substància negra, nucli subtalàmic i tàlem (Paoloni-Giacobino et al., 1997). L'expressió es va incrementant en tot el cervell des d'estadis embrionaris fins al període postnatal, en que es manté estable. La regió que presenta més expressió de Ncam2 és el bulb olfatori, regió en la qual s'han focalitzat els estudis funcionals fets fins l'actualitat. (Alenius and Bohm, 1997; Paoloni-Giacobino et al., 1997; Yoshihara et al., 1997).

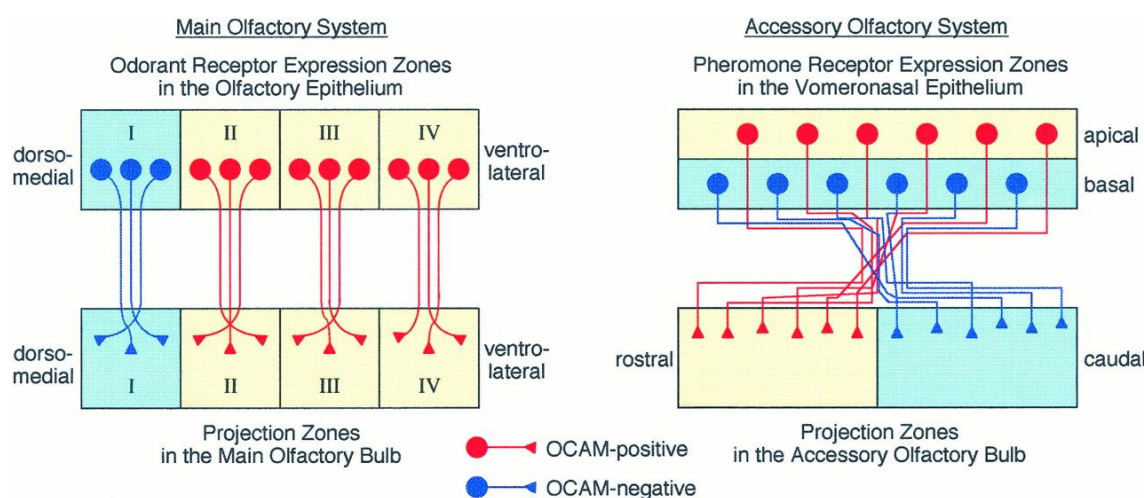
### 7.4 Funcions

Tot i l'expressió elevada de Ncam2 en el tot el sistema nerviós central, els estudis funcionals s'han focalitzat en la funció de Ncam2 al bulb olfatori. En els últims anys, s'ha començat a estudiar més a fons la funció de Ncam2 en altres regions del sistema nerviós central, com el còrtex, l'hipocamp o la medul·la espinal (Deleyrolle et al., 2015; Leshchyns'ka et al., 2015; Sheng et al., 2015).

Fora del sistema nerviós, s'ha detectat una sobreexpressió de Ncam2 en determinats càncers, com per exemple de pròstata (Takahashi et al., 2011; Xu et al., 2001). Aquest augment de l'expressió aniria associat a la desregulació del factor de transcripció STAT5, que actua com a oncogen (Nelson et al., 2006).

#### 7.4.1 Bulb olfatori

En el desenvolupament del bulb olfatori, les connexions al glomèrul s'organitzen depenent de l'expressió de Ncam2. D'aquesta manera, les neurones sensorials de l'epiteli olfatiu i de la zona apical de l'epiteli vomeronasal que expressen Ncam2 projecten els axons que realitzen sinapsis amb les neurones mitrals ventrals del bulb que no expressen Ncam2. De forma



**Figura 1.5.2. Representació esquemàtica de les projeccions axonals de l'epiteli olfatiu i vomeronasal.**

En el desenvolupament del bulb olfatori, les connexions al glomèrul s'organitzen depenent de l'expressió de Ncam2. D'aquesta forma les neurones sensorials de l'epiteli olfatiu i de la zona apical de l'epiteli vomeronasal que expressen Ncam2, de color vermell, projecten els axons que realitzen sinapsis amb les neurones mitrals ventrals del bulb que no expressen Ncam2. De forma contrària, les neurones sensorials de l'epiteli olfatiu i de la zona basal de l'epiteli vomeronasal que no expressen Ncam2, color blau, projecten els axons que realitzen sinapsis amb les neurones mitrals dorsals del bulb que expressen Ncam2. Adaptat de (Yoshihara et al., 1997).

contrària, les neurones sensorials de l'epiteli olfatiu i de la zona basal de l'epiteli vomeronasal que no expressen Ncam2 projecten els axons que realitzen sinapsis amb les neurones mitrals dorsals del bulb que expressen Ncam2, figura 1.5.2 (Alenius and Bohm, 1997; Treloar et al., 2003; Yoshihara et al., 1997).

Ncam2 participa en la segregació de les connexions que es realitzen al glomèrul, en la fasciculació i en creixement axonal (Hamlin et al., 2004). L'animal que té un dèficit de Ncam2 presenta defectes en la compartimentalització i segregació dels contactes del glomèrul (Walz et al., 2006). Aquests resultats indiquen que Ncam2 és clau en la formació i desenvolupament del sistema olfatiu, i participa en l'organització de dendrites i axons en el bulb olfatori. La seva expressió restringida serveix per facilitar la regionalització durant el desenvolupament, que permet la posterior connexió i processament de les senyals. La hipòtesi general en el bulb seria que Ncam2 interacciona amb un receptor desconegut de les neurones negatives per Ncam2, que controla el creixement dendrític i axonal, facilitant l'agrupació i maduració dels contactes. De totes maneres, no s'ha demostrat que sigui imprescindible per la formació de sinapsis en el bulb (Walz et al., 2006).

A nivell electrofisiològic, l'animal deficient per Ncam2 que presenta artefactes en la compartimentalització també presenta canvis en l'activitat neuronal sincrònica del glomèrul. La pèrdua de Ncam2 produeix, doncs, canvis funcionals. D'aquesta manera es pot afirmar que Ncam2 és important per la compartimentalització i la correcta formació dels circuits per tal de processar la informació sensorial del bulb (Borisovska et al., 2011; Walz et al., 2006).

#### 7.4.2 Còrtex i hipocamp

Ncam2 s'expressa també en el còrtex. La seva funció no ha estat tant estudiada com en bulb, però els diferents estudis realitzats mostren funcions semblants a les descrites pel bulb. Durant el desenvolupament del còrtex, Ncam2 s'acumula a les dendrites en formació, facilitant l'establiment i formació dels contactes. La senyal detectada mostra diferents patrons d'expressió, Ncam2 positius i negatius, semblants als descrits en la regionalització del bulb (Ichinohe et al., 2003).

A nivell *in vitro*, Ncam2 participa en el procés de neuritogènesi de les neurones corticals. Ncam2 activa c-Src, que facilita l'increment de calci intracel·lular a través dels canals L-VDCC. L'increment de calci activa CaMKII, que promou la formació i el creixement de les neurites (Sheng et al., 2015).

En neurones hipocampals *in vitro*, Ncam2 està enriquida en les sinapsis. La pèrdua de la funció de Ncam2 provoca una pèrdua de l'estructura sinàptica: es desestructuren les sinapsis glutamèrgiques. Una reducció de Ncam2 produeix un increment dels contactes no sinàptics i una reducció dels contactes sinàptics. Els contactes no sinàptics són espines no funcionals, ja que no presenten les proteïnes que configuren l'estructura presinàptica o postsinàptica. Per tant, Ncam2 és necessària en el manteniment de l'estructura sinàptica (Leshchyn'ska et al., 2015).

#### 7.4.3 Medul·la espinal

Ncam2 està expressada en el tub neural durant el desenvolupament i en les cèl·lules mare neuronals de la medul·la espinal. A les medul·la espinal hi ha una petita població de cèl·lules mare. La proliferació i la diferenciació d'aquestes cèl·lules estan controlades per diferents

senyals externes. Les molècules d'adhesió cel·lular, com L1CAM o Ncam1, a través de les interaccions intracel·lulars o extracel·lulars, influeixen en aquests processos de diferenciació. Les neuroesferes que provenen de les cèl·lules mare de la medulla espinal expressen Ncam2. La funció de Ncam2 és el control de la proliferació neuronal a través de la internalització i degradació dels receptors del factor de creixement d'epidèrmic (EGFR): no es produeix una interacció directa entre el receptors i Ncam2. Ncam2 modula la senyalització de EGF clau pel manteniment i proliferació de les cèl·lules mare neuronals a través de la regulació del receptor (Deleyrolle et al., 2015).

## 7.5 Ncam2 en patologies neuronals

Durant els últims anys, l'estudi de la funció de Ncam2 en malalties neurodegeneratives ha anat incrementant. S'ha descrit que Ncam2 podria estar implicada en diferents malalties neurodegeneratives:

- **Síndrome de Down:** La localització de Ncam2 en el cromosoma 21 suggereix un efecte en el síndrome degut a l'augment de l'expressió durant el desenvolupament. Tot i no trobar-se a la regió crítica del síndrome Down, és un gen que podria justificar els errors en la formació de l'estructura neuronal, com per exemple la ramificació de les dendrites, reduïda en síndrome de Down (Becker et al., 1986; Makino and McLysaght, 2010; Sheng et al., 2015; Takashima et al., 1994).
- **Autisme:** polimorfismes i delecions del gen en *ncam2* s'han associat amb la malaltia de l'autisme. Aquestes modificacions podrien causar defectes en el desenvolupament i formació de l'arbre dendrític (Haldeman-Englert et al., 2010; Molloy et al., 2005; Scholz et al., 2016).
- **Malaltia d'Alzheimer (AD):** Ncam2 s'ha vist associada en al manteniment de les sinapsis en hipocamp. En els estadis inicials de la malaltia d'Alzheimer es produeix una reducció de les sinapsis. S'ha observat que la unió de Ncam2 amb A $\beta$  incrementa el tall extracel·lular de Ncam2, provocant una desorganització de la sinapsis que condueix a una pèrdua d'aquestes (Leshchyns'ka et al., 2015; Leshchyns'ka and Sytnyk, 2016). S'ha observat també que polimorfismes en el gen *ncam2* són un factor de risc en la progressió de l'AD (Kimura et al., 2007). Els polimorfismes també s'han associat amb els nivells de A $\beta$  en el líquid cefaloraquídi (Han et al., 2010). A més a més, en un estudi de pacients d'Alzheimer i polimorfismes en cèl·lules somàtiques, es va detectar en un pacient un polimorfisme específic en el gen *ncam2* en cervell, que conjuntament amb les altres polimorfimes detectats podria contribuir a la causa de la malaltia (Parcerisas et al., 2014).
- **Altres patologies:** També s'han detectat diferents desordres mentals associats a Ncam2, que no es restringeixen a una patologia neuronal concreta sinó que presenten diferents problemes neuronals associats a un possible error en el desenvolupament (Petit et al., 2015).





# Objectius



El desenvolupament i el manteniment de les connexions neuronals inclouen múltiples processos on hi han involucrats moltes proteïnes i vies de senyalització que modulen una estructura clau com és el citoesquelet. La superfamília de les immunoglobulines i en concret les molècules d'adhesió cel·lular són essencials al llarg de tots els processos. Ncam2 és una proteïna d'adhesió expressada en cervell des d'estadis embrionaris que es manté en adult. L'objectiu central d'aquesta tesi és la caracterització del paper de Ncam2 en cervell tant en el desenvolupament del còrtex i l'hipocamp com en el manteniment de les connexions en cervell adult. Per respondre a aquesta qüestió la tesi s'ha dividit en diferents objectius més concrets:

- 1. Estudi del patró d'expressió de Ncam2 en desenvolupament i adult.**
  - Patró de l'expressió de l'ARNm de Ncam2 en cervell el desenvolupament del sistema nerviós.
  - Patró de l'expressió de la proteïna Ncam2.
- 2. Determinació del paper de Ncam2 en la polarització neuronal.**
  - Caracterització de l'efecte de la modulació de l'expressió de Ncam2 en la formació de l'arbre dendrític i axonal.
  - Caracterització de l'efecte de Ncam2 sobre les dinàmiques de microtúbuls.
- 3. Efecte de Ncam2 en la formació del còrtex.**
  - Caracterització de l'efecte de la modulació de l'expressió de Ncam2 durant la migració radial i el posicionament neuronal en el desenvolupament del còrtex.
- 4. Paper de Ncam2 en la plasticitat neuronal de l'hipocamp en cervell adult.**
  - Estudiar l'efecte de la pèrdua de Ncam2 en les sinapsis de neurones hipocampals adultes.
  - Caracterització de l'efecte de la sobreexpressió de Ncam2 en la divisió dels progenitors neuronals de la zona subgranular del gir dentat.
- 5. Estudi de l'interactoma de Ncam2.**
  - Identificació de proteïnes que interaccionen amb Ncam2 per espectrometria de masses.
  - Estudi bioinformàtic de les proteïnes que interaccionen per comprendre els mecanismes a través dels quals Ncam2 realitza la seva funció.





# **Materials i mètodes**



## Material

### Animals

Els animals utilitzats en aquest estudi són ratolins de les soques C57Bl/6J o CD1. S'han utilitzat animals en estadis embrionaris, post-natals i adults. Es considera el dia d'aparellament com dia embrionari 0, E0, i el dia de naixement com a dia post-natal 0, P0. Tots els procediments amb ratolins es van fer seguint les instruccions directives de la Comunitat Europea i Estats Units i els comitès ètics de la Universitat de Barcelona i la Universitat de Califòrnia, Davis.

### Reactius

Els reactius comuns per preparar els diferents tampons són fabricats per Sigma-Aldrich i Pancreac.

### Anticossos

Els anticossos comercials utilitzats són:

Anticòs	Referència	WB	Immunodeteccions
anti-Actina	Chemicon, MAB1501	1/10000	
anti-Cux1	SantaCruz M222		1/50
anti-Ctip2	Abcam ab18465		1/500
anti-GFAP	Merck, MAB360		1/2000
anti-GFAP	DAKO, Z033401		1/2000
anti-GFP	Bio-Rad, 4745-1051		1/500
anti-GFP	Invitrogen A11122	1/2000	1/1000
anti-Granulin	R&D Systems AF2557	1/500	
anti-Map2	Sigma, MA1406		1/2000
anti-Ncam2	R&D Systems, AF778	1/500	1/200
anti-Ncam2.1	Everest, EB06991	1/500	1/200
anti-NeuN	Merck, MAB377		1/1000
anti-Pax6	Abcam ab5790		1/100
anti-Tbr1	Abcam Ab31940		1/1000
anti-Tubulina	Covance, MMS-431P	1/10000	1/2000
anti-Tubulina acetilada	Sigma T6793		1/200000
anti-Satb2	Abcam ab51502		1/200
anti-Sox2	Abcam, ab97959		1/500
anti-pan14-3-3	SantaCruz 1657	1/500	1/50

WB: dilució realitzada per realitzar l'experiment de western-blot.

Immunodeteccions: dilució realitzada per les deteccions amb fluorescència, tant en teixit com en cultius cel·lulars

Els anticossos secundaris en la d'immunofluorescència són:

<b>Anticòs</b>	<b>Referència</b>
Alexa 568, donkey anti-mouse	A10037
Alexa 488, donkey anti-goat	A11055
Alexa 488, goat anti-chicken	A11039
Alexa 546, donkey anti-mouse	A10036
Alexa 488, goat anti-mouse	A 11029
Alexa 568, goat anti-mouse	A 11031
Alexa 660, goat anti-mouse	A 21054
Alexa 660, goat anti-rabbit	A21074
Alexa 488, goat anti-rabbit	A 11070
Alexa 568, goat anti-rabbit	A 21069
Alexa 488, donkey anti-sheep	A 11015

La dilució utilitzada és de 1/500 per tots els anticossos secundaris. Altres reactius fluorescents: DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) fal·loïdina-FITC. Tant el DAPI com la fal·loïdina s'utilitzen amb una dilució 1/200.

## **ADN**

Els encebadors utilitzats són produïts i subministrats per Invitrogen. Els enzims de restricció són produïts i subministrats per New England Biolabs. Els plasmidis comercials provenen de Addgene.

El plasmidi EB3-Tomato és cedit pel laboratori de Jens Lüders.

El plasmidi pCR4-TOPO-Ncam2.2 (Biogen).

Els plasmidis pcDNA3.1, pWPI i pVLTHM (Addgene).

## **Programari**

Densitometria dels western-blot: gel pro32.

Anàlisi de cometes: Kymograph.

Anàlisi estadístic: GraphPad Prism 5.

Processament i anàlisi d'imatges: FIJI

Anàlisi bioinformàtic: Versió String 10.0

## Mètodes

### Plasmidis

**Obtenció de pCNcam2.2:** el cDNA de la isoforma Ncam2.2 del vector pCR4-TOPO es va amplificar amb els encebadors 5'-ACTGGAATTCGTGGCAGCGGAAGGTTCTC-3' i 5'-ACTGTCTAGAAATTCAGGGGAAGGCGAAT-3'. Es va purificar el fragment de 2405pb, es va digerir amb els enzims EcoRI i XbaI i es va subclonar en el vector pCDNA3.1, obtenint el vector pCNcam2.2, que sobreexpressa la isoforma Ncam2.2.

**Obtenció de pCNcam2.1:** Utilitzant mostres de ARNm d'hipocamp retrotranscrites es va amplificar la part C-terminal del cDNA de Ncam2.1 utilitzant els encebadors 5'-ACTGGAATTCGTGGCAGCGGAAGGTTCTC-3' i 5'-GTGGCTAGAGAAGAAGGTAC-3', s'obtenint un fragment de 760bp. Aquest fragment es va digerir amb els enzims PstI i XbaI i es va subclonar en el vector pCNcam2.2 prèviament digerit amb els mateixos enzims, obtenint pCNcam2.1, que sobreexpressa Ncam2.1.

**Obtenció de pWPI-Ncam2.1:** el cDNA d'interès es va amplificar del pCNcam2.1 amb els encebadors fosforilats 5'-ACCATGAGCCTCCTCCTCTCC-3' i 5'-CTGACCAAGGTGC TGAAACT-3'. El fragment de 2542pb va ser purificat i subclonat en el vector pWPI (Addgene), prèviament digerit amb l'enzim PmeI.

**Obtenció de pWPI-Ncam2.2:** el cDNA d'interès es va amplificar del pCNcam2.2 utilitzant els encebadors fosforilats 5'-A CCATGAGCCTCCTCCTCTCC-3' i 5'-TCTCTGATCAGGGAGTACCA-3'. El fragment de 2271bp va ser purificat i subclonat en el vector pWPI, prèviament digerit amb l'enzim PmeI.

**Obtenció de la sonda del mRNA de la isoforma Ncam2.1:** es va amplificar la zona 3' del mRNA de la isoforma Ncam2.1 amb els encebadors 5'- ATGCGCGCCGCGGGTTACTAATGTGCATCAC-3' i 5'- ATGCGCGCCGCTCCACTGTGGGTGAATATGG-3', que amplifica un fragment de 1078pb des del nucleòtid 2405. A continuació es va clonar aquest fragment al vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen), seguint el protocol de la casa comercial. Per obtenir les sondes es va utilitzar el protocol i reactius de Roche i es va preparar la solució amb 1µg de DNA, 4µL de tampó de transcripció 10x (Roche), 4µL de Dig Mix 10x, 2µL de DTT 100mM, 4µL de inhibidor de RNAses, 4µL de les polimerases T7 o SP6 i es va afegint aigua fins a un volum final de 40µL. Es van utilitzar les dues polimerases, T7 o Sp6, per generar les sondes que hibriden amb el DNA i una sonda control. Posteriorment es van precipitar les sondes amb etanol i es van resuspendre amb aigua-DEPC.

**Obtenció dels plasmidis mutats de Ncam2.1 i Ncam2.2:** els vectors pCNcam2.1 i pCNcam2.2 es van amplificar per PCR introduint 5 punts de mutació a través de dues reaccions consecutives de mutagènesi dirigida (QuickChange II, Agilent Technologies). Els encebadors són comuns per les dues isoformes perquè la zona d'hibridació del ShNcam2 és a la regió comuna entre les dues. Els encebadors utilitzats a la primera reacció van ser: 5'-AGAGAAGAAGGTAC AGGGAAACAAGGACCACATTATCTTGGAGC-3' i 5'-AGATCAGTGGCTAGAGA AGAAAGTTCAGGGTAACAAGGACCA-3', i per la segona reacció; 5'-GCTCCAAGATAATGTGGTCCTTGTTCCTGTACCTTCTCTCT-3' i 5'-GATAATGTGGTCCTTGT TACCCTGAACCTTCTCTCTAGCCACTGATCT-3'. Els resultat dels productes s'anomenen Ncam2.1Mt i Ncam2.2Mt.

**Obtenció dels plasmidis ShRNAs:** La seqüència diana del ShRNA específic de Ncam2, ShNcam2, és entre les bases 2143-2161, corresponent a la zona homòloga del ARNm de les dues

isoformes. Per obtenir el ShRNA s'introdueix aquesta seqüència 5'-CGCGTCCCCGAAGGTACAGGGAAATAAATTCAAGAGATTTATTTCCCTGTACCTTCTTTTTGGAAAT-3' al plasmidi pVLTHM. Com a seqüència control, ShCnt, s'utilitza la següent seqüència: 5'-GATCCCCGCAAGTCAATATCGGAAACTTCAAGAGAGTTTCCGATATT-GCACTGCTTTT-3'.

### **Cultius cel·lulars**

Les cèl·lules HEK 293 i 293T, cèl·lules embrionàries de ronyó humà, van ser cultivades amb el següent medi: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (sèrum fetal boví), 1% de L-Glutamina, Penicil·lina 20U/mL i estreptomina 20U/mL (P/S).

Les cèl·lules 293FT, utilitzades per l'obtenció de virus, procedeixen d'una línia cel·lular adaptada de les 293F (línia adaptada de la línia cel·lular HEK293T amb l'adenovirus humà tipus 5 truncat per expressar una major quantitat de proteïna) que expressa de forma estable l'antigen T major del SV40 sota el promotor del citomegalovirus humà (CMV). Amb aquestes modificacions les cèl·lules 293FT estan dissenyades per optimitzar la producció de virus. El medi de les cèl·lules 293FT conté: DMEM, 10% FBS, 1% de L-Glutamina, penicil·lina 20U/mL, estreptomina 20U/mL (P/S), 10mM NEA-MEM (aminoàcids no essencials), 100mM piruvat sòdic i geneticina 500µg/mL.

### **Generació de línies cel·lulars estables**

Es va utilitzar cèl·lules 293. Primer es va testar la dosi de geneticina necessària per seleccionar les cèl·lules transfectades. La dosi correcta és aquella a la que després de transfectar les cèl·lules i canviar el medi amb geneticina les cèl·lules estan vives al cap de 5DIV però presenten un mortalitat superior al 90% a 10DIV. La dosi necessària en el nostre disseny experimental va ser de 500µg/mL. Es van transfectar les cèl·lules 293 amb els vectors d'interès utilitzant Lipofectamina2000 (Invitrogen) seguint el protocol descrit per Invitrogen. Es van mantenir les cèl·lules amb el medi de cultiu amb la concentració de geneticina durant 3 setmanes.

### **Assaig MTT**

Les línies estables pcDNA3.1, pcNcam2.1 i pcNcam2.2 es van plantar en plaques de 96 pous a una dilució de 5000 cèl/pou en un volum de 100 µl. Per a cada condició es va fer un total de 3 experiments independents amb 2 plaques per cada i 3 pous de rèpliques. Es va seguir l'assaig durant 5 dies consecutius i es va elaborar una corba de creixement. Les cèl·lules es van incubar amb 10 µl del reactiu MTT (4 h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) i es van lissar amb 100 µl de solució de lisi (10% SDS, 0.01M HCl). Al cap 12-18 h es va mesurar l'absorbància a 595 nm.

### **Cultius neuronals embrionaris**

Pels cultius primaris d'hipocamp o telencèfal s'utilitzen cervells de ratolins en estadi embrionari 16. La dissecció es realitza en PBS-Glucosa 3% i s'extreuen les regions d'interès. Posteriorment, s'afegeix Tripsina durant 7 min a 37°C. A continuació s'inactiva la Tripsina amb l'addició de sèrum normal de cavall (NHS) a la solució amb una proporció 1:2 (NHS: solució). S'addiciona DNasa, concentració final 10U/mL, es deixa la mescla a 37°C durant 5min. Es disgrega mecànicament la dissolució pipetejant 40 vegades amb la pipeta de 1mL. A continuació es centrifuga la mescla a 800rpm durant 5min a 4°C. Es descarta el sobrenedant i el precipitat es resuspèn amb el medi de cultiu: Neurobasal, 2% B27, 1x Glutamax i P/S suplementat amb medi condicionat de glia (Neurobasal, 2% B27, 1x Glutamax, 20 unitats/mL de P/S mantingut en cultius confluents de glia un mínim de 15 dies) i es compten les cèl·lules

amb càmera de Neubauer. Les neurones es planten en diferents superfícies segons convingui. En cas de necessitar mostres per western blot, es planten  $2 \times 10^6$  neurones en pous de 35mm de diàmetre. En cas de necessitar mostres per immunocitoquímica, es planten 75.000 neurones en vidres de 12mm de diàmetre. Per experiments superiors a 7 dies in vitro (DIV) la densitat és de 50.000 neurones en vidres de 12 mm. Les superfícies d'adhesió reben un tractament previ amb poli-D-lisina 0.5 i 0.05mg/mL respectivament per vidre i plàstic durant 12h. Les neurones s'incuben a 37°C amb el 5% de CO<sub>2</sub>.

## **Transfecció**

### ***Cèl·lules 293T***

Les cèl·lules 293T es desenganxen utilitzant Tripsina, 3min a 37°C. A continuació s'inactiva la Tripsina amb l'addició de sèrum 10% FBS. Es centrifuguen les cèl·lules a 800rpm durant 5min, es compten i es planten 70000 cèl·lules/cm<sup>2</sup> (confluència del 60-70%). El dia següent es realitza la transfecció utilitzant i seguint el protocol de Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen). Al final de la transfecció es canvia el medi a OptiMEM i es deixen 72h.

### ***Cèl·lules neuronals***

Els cultius neuronals es van transfectar amb Lipofectamina2000, a dies variables depenent de l'estudi: a 3-4DIV en els estudis de formació de l'arbre dendrític i els experiments de cometes. Abans de la transfecció es va retirar 2/5 parts del medi de cada pou i es van conservar les cèl·lules a 37°C. Per a cada pou es van preparar les mescles corresponents: (1) 2µg de DNA en 50 µl de medi OptiMEM (4µg en 250µl per pous de 9cm<sup>2</sup>); (2) 2 µl Lipofectamina2000 en 50 µl d'OptiMEM ( 10µL en 250µl per pous de 9cm<sup>2</sup>). Les mescles es van incubar 5 min i es van barrejar en un únic tub. Transcorreguts 20 min, es van transfectar les cèl·lules afegint la mescla als pous. Es va deixar la transfecció 40 min i es va canviar el medi (½ medi prèviament recollit i ½ medi nou). Les cèl·lules transfectades van ser utilitzades pels diferents protocols a diferents dies: 6-7 DIV.

### **Comprovació dels plasmidis de silenciament i rescat**

Es van plantar 600000 cèl·lules 293T en pous de 35mm. El dia següent es van co-transfectar amb els plasmidis de sobreexpressió de Ncam2 (pCNcam2.1/ pCNcam2.2/pCNcam2.1Mt/ pCNcam2.2MT) i el plasmidi ShRNA (ShCnt o ShNcam2) en proporció 3:1, respectivament. Les cèl·lules es van lissar amb la solució de lisi: Tris-Base (2-Amino-2-hidroximetil-propà-1,3-diol) 125mM, 2% SDS (dodecilsulfat sòdic) pH 6.8. Posteriorment es va seguir el protocol de preparació de mostres per a western blot.

### **Tractament amb Taxol**

Els cultius neuronals es van transfectar a dia 3DIV seguint el protocol descrit en l'apartat de transfeccions. Després de 24h es va afegir 1.5µL d'una solució 1mM de Taxol o vehicle, dimetilsulfòxid (DMSO), al medi de les neurones, concentració final 3µM de Taxol. El cultiu es va fixar després de 3 dies al 7DIV amb PFA (paraformaldehid) al 4% amb PB (tampó fosfat) 0.1M durant 20min. Pels comptatges es van analitzar entre 10-15 neurones per experiment, de 3 experiments independents. Per l'anàlisi estadístic, aquests valors es van analitzar amb un ANOVA i un posttest de Turkey per comparar les diferents condicions entre elles.



### **Seguiment de les neurones al llarg del temps (*time course analysis*)**

Les neurones estaven plantades en unes plaques que tenen marcada una quadrícula que permet la localització específica d'aquestes (35mmDish/No.1.5 Gridded Coverslip/14mm Glass Diameter, Mattek). El 3DIV es van transfectar seguint el protocol de transfecció de cultius neuronals. Les proporcions de DNA van ser 1:3 del plasmidi pEGFP-N3: ShRNA. A partir del 4DIV, les neurones es van fotografiar cada 24h utilitzant l'objectiu de 60x en el microscopi Olympus IX81 equipat amb un Yokogawa CSU-X1 spinning disc. Les neurones es van mantenir en una cambra incubadora a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. El 7DIV es van adquirir imatges de forma consecutiva cada 30segons durant 30min. Posteriorment a l'adquisició de les imatges, es van fixar els cultius utilitzant PFA4% i es va realitzar una immunohistoquímica amb diferents anticossos (anti-MAP2, fal-loïdina i anti-GFP, Bio-Rad). Les imatges de immunofluorescència es van adquirir en el microscopi de Olympus ScanR-Xcellence-TIRF.

### **Polimerització dels microtúbuls**

Els experiments d'estudi de la polimerització dels microtúbuls es van realitzar seguint el protocol descrit prèviament (Sanchez-Huertas et al., 2016). Les neurones es van plantar, i a 4DIV es van transfectar seguint el protocol descrit en l'apartat de cultius neuronals. La proporció de DNA utilitzat en la transfecció va ser 1:3 dels plasmidis EB3-Tomato: ShRNAs. Després de 48h es va realitzar l'adquisició de les imatges dels cometes en el segment proximal de l'axó utilitzant un microscopi Olympus IX81 equipat amb un Yokogawa CSU-X1 spinning disc. Les neurones es van detectar en el canal del verd, ja que expressaven GFP, i en el canal vermell es van capturar les imatges de l'EB3-Tomato. Les imatges es capturen cada segon durant 2.5min. Les neurones es van mantenir en una cambra incubadora a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. Per l'anàlisi dels diferents paràmetres de polimerització es van mesurar els cometes de entre 10 i 15 fragments axonals, de 2 experiments independents. Per l'anàlisi estadístic, els valors es van analitzar amb un test-t per comparar els diferents grups.

### **Preparació de teixit neuronal per histologia**

Els ratolins es van perfondre amb una perfusió intracardiaca amb una solució de PFA (paraformaldehid) al 4% amb PB (tampó fosfat) 0.1M durant 15 minuts. Posteriorment es van extreure els cervells dels ratolins i es van deixar amb la solució de PFA 4%. El següent dia es va submergir el cervell a una solució crioprotectora: sacarosa al 30% en PBS 0.1M, on s'ha de mantenir com a mínim d'un dia. Posteriorment es va congelar el teixit i es va tallar amb un micròtom de congelació (Leica SM 2010R) amb un gruix variable segons l'interès entre 30-50µm i es va repartir en series de 10 eppendorfs, que contenia una solució crioprotectora per la congelació: PBS 0.1M, 30% Glicerol i 25% Etilenglicol.

### **Immunodetecció amb diaminobenzidine (DAB)**

Les immunodeteccions amb DAB en talls de teixit, procediment *Preparació de teixit neuronal*, es realitzen en suspensió i agitació constant. El teixit es renta per triplicat amb PB i posteriorment també per triplicat amb PBS. A continuació s'afegeix la solució d'inactivació de peroxidases, PBS-3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 10% Metanol i es deixa en agitació 20minuts. Es realitzen rentats amb PBS i posteriorment amb PBS-Tritó X-100 al 0.3% (PBST). A continuació es posa la solució de bloqueig, PBS 0.2%gelatina, 10% NGS, 0.02%azida i 0.3%Tritó X-100, durant 2h. En el cas d'utilitzar anticossos primaris procedents de cèl·lules murines s'afegeix també Fab anti-mouse

(1:300). Es realitzen rentats amb PBST i s'incuba tota la nit (o/n) amb la solució d'anticòs primari; PBS-0.2%gelatina, 5%NGS, 0.02%azida, 0.3%Tritó X-100 i la concentració corresponent d'anticòs primari (mirar la taula d'anticossos). El dia següent es retira la solució i es realitzen rentats amb PBST. Posteriorment s'incuben els talls durant 2 hores amb la solució d'anticòs secundari biotinitat, PBS-0.2%gelatina, 5%NGS, 0.3% Tritó X-100 i anticòs 2ari biotinitat (1:200). A continuació es realitzen rentats amb PBST per prosseguir amb la incubació durant 2 hores amb la solució d'estraptividina-peroxidasa, PBS-0.2%gelatina, 5% NGS, 0.3% Tritó X-100 i estraptividina-peroxidasa (HRP) (1:400). Posteriorment es realitzen rentats per triplicat de PB i PBS consecutivament. A continuació es realitza un rentat amb PB i es pot iniciar la incubació amb la solució de PB, 0.03% diaminobenzidine (DAB) i 0.3% de Sulfat de Níquel. El revelat es realitza amb l'addició de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una concentració final de 0.01%,. El temps de revelat depèn de la intensitat de la senyal. Aturem el revelat realitzant rentats amb PBS. A continuació es posen els talls en portaobjectes adhesius i es deixen assecar a 37°C o/n. El dia següent es realitza la deshidratació del teixit, que consisteix en deixar de forma seqüencial els portaobjectes durant 2 minuts a la següents dilucions: Etanol 70%, Etanol 90%, Etanol 100% (2 vegades) i Xilè (2 vegades). Quan el teixit està deshidratat es pot muntar el cobreobjecte posant la solució de l'Eukit.

### **Immunofluorescència**

Les immunocitofluorescències de talls de teixit es realitzen en suspensió i agitació constant. El teixit es renta per triplicat amb PBS i posteriorment amb PBS-Tritó X-100 al 0.3% (PBST). A continuació es posa la solució de bloqueig, PBS 0.2%gelatina, 10% NGS , 0.02%azida i 0.3%Tritó X-100, durant 2h. En el cas d'utilitzar anticossos primaris procedents de cèl·lules murines s'afegeix també Fab anti-mouse (1:300). Es realitzen rentats amb PBST i s'incuba tota la nit (o/n) amb la solució d'anticòs primari, PBS-0.2% gelatina, 5% NGS, 0.02% azida, 0.3% Tritó X-100 i la concentració corresponent d'anticòs primari (mirar la taula d'anticossos). El dia següent es retira la solució i es realitzen rentats amb PBST. Posteriorment s'incuben els talls durant 2 hores amb la solució d'anticòs secundari, PBS-0.2% gelatina, 5% NGS, 0.3% Tritó X-100 i anticòs 2ari (mirar la taula d'anticossos secundaris). En cas d'utilitzar fal·loïdina i/o DAPI s'addicionen a aquesta solució. A continuació es realitzen rentats amb PBST. Posteriorment es posen els talls en portaobjectes adhesius i es posa el medi de muntatge, Mowiol.

### ***Immunofluorescència en cèl·lules***

Les cèl·lules, prèviament fixades, es permeabilitzen i bloquegen amb PBS 0.1M pH 7.4 amb Tritó X-100 al 0.1% i 10 % NHS durant 1h. Posteriorment, s'incuben durant 2h amb l'anticòs primari diluït en una solució que conté PBS 0.1M pH 7.4 amb Tritó X-100 al 0.1% i 5% NHS. A continuació, s'incuben 2h amb l'anticòs secundari diluït amb la solució amb la mateixa composició, PBS 0.1M pH 7.4 amb Tritó X-100 al 0.1% i 5% NHS. En cas d'utilitzar fal·loïdina i/o DAPI s'addicionen en aquesta solució. Finalment, es posa el medi de muntatge, Mowiol, als portaobjectes i per inversió es diposita els vidres on hi han adherides les cèl·lules. Després es deixa assecar el medi de muntatge per poder fer l'observació i adquisició de les imatges.

### **Adquisició d'imatges i quantificació de paràmetres dendrítics i axonals**

Les imatges per la quantificació dels paràmetres axonals i dendrítics es van adquirir utilitzant el l'objectiu de 20x del microscopi LEICA E1000 i el programa MetaMorph. Pels comptatges es van analitzar entre 10-15 neurones per experiment, de 3 experiments independents. Per

l'anàlisi estadístic, aquests valors es van analitzar amb un test-t o ANOVA per comparar els diferents grups. En cas de les ANOVA s'utilitzava un posttest de Turkey per comparar les diferents condicions entre elles.

L'anàlisi de Sholl i els paràmetres dendrítics i axonals es van analitzar amb l'aplicació de NeuronJ de FIJI. Les interseccions dels Sholls es van analitzar cada 10µm. Es van analitzar entre 10-15 neurones, de 3 experiments independents

### ***Adquisició d'imatges de caracterització de l'expressió Ncam2***

Les imatges per la caracterització del patró d'expressió de Ncam2 van ser adquirides amb l'objectiu de 20x en l'escàner NanoZoomer-2.0 HT C9600 (Hamamatsu, Photonics, France) acoplat a font de mercuri L11600-05 i utilitzant el software NDP.scan2.5 U10074-03 (Hamamatsu, Photonics, France).

Les senyals de DAPI i 488 (Ncam2) van ser adquirides amb un temps d'exposició de 28ms i un gain de 2 per les mostres de postnatal 0, 5 i 15, i de 57ms i un gain de 4 per les mostres de embrionari 14 i 16.

Les imatges mostrades a la memòria es van extreure en format .tiff aplicant una gamma de correcció de 1.8 exportades a través del programa NDP.view 2 U12388-01 software (Hamamatsu, Photonics, France).

### ***Adquisició d'imatges de col·localització de Ncam2.1 amb Map2 i actina***

Les imatges per a la caracterització de la col·localització de Ncam2.1 amb Map2 i actina van ser adquirides amb l'objectiu de 60x i un zoom 2 en el microscopi confocal Sp5 (Leica). Les imatges van ser processades pel programa FIJI escollint un únic pla. Per la quantificació de la intensitat de la senyal s'utilitza l'aplicació de "Plot Profile" de FIJI.

### ***Electroporacions in utero***

Les electroporacions *in utero* es realitzen seguint el protocol descrit prèviament (Simo et al., 2010; Tabata and Nakajima, 2001). Les femelles gestants CD-1 es microinjecten i electroporen a E14.5. Les agulles de vidre utilitzades s'estiren i es formen utilitzant un Puller (Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter instrument). Les agulles estan calibrades per injectar 1µL. La solució de DNA (per 1µL: 2µg de plasmidi d'estudi (pWPI, pWPI-Ncam2.1, pWPI-Ncam2.2, ShNcam2 i ShCnt) i 0,5µg del plasmidi reporter GFP o ChFP) es dilueix amb una solució 10mM Tris pH 8 i 5% Fast Green. Les femelles gestants s'anestesien amb isofluorà al 5% en aire. Pell i musculatura abdominal es tallen i s'exposa la matriu, on hi ha els embrions. S'introdueix 1 µL de la solució que conté DNA als ventricles amb l'agulla. Per l'electroporació s'utilitzen electrodes de fòrceps amb un diàmetre de 5mm (Nepagene), i es realitzen 5 pols de 50msec a 30V. A continuació s'introdueix l'úter a l'interior de la femella i es tanca la musculatura amb fil de sutura i la pell amb grapes quirúrgiques. Es retira l'anestèsia i s'espera que es recuperi la femella per tornar-la a la gàbia. L'estat de les grapes es controla cada dia fins al dia de sacrifici.

### ***Obtenció dels cervells electroporats***

Els embrions electroporats a 14,5DIV es recullen a 19,5 DIV i s'extreu el cervell. Els cervells electroporats es confirmen amb l'ajut d'un microscopi d'epifluorescència (Leica). Els cervells electroporats correctament són fixats en 4% de Formalina PBS 0.1M com a mínim durant 6h. A continuació, s'introdueixen en una solució crioprotectora de 30% de sacarosa PBS 0.1M. Els

cervells són congelats amb una mescla 1:1 de 30% sacarosa i O.C.T. (optimal cutting temperature, Van Loenen Instrument). A continuació, es tallen amb l'ajut d'un criostat (Leica CM 1900) a un gruix de 14µm i s'adhereixen a portaobjectes adhesius.

### ***Immunodetecció dels talls de cervells electroporats***

Primer es realitza un tractament de recuperació de l'antigen a través d'un tractament de citrat de sodi 0.01M pH 6.0 durant 20min a 95°C. A continuació, es realitzen tres rentats amb PBS 0.1M durant 5min. Posteriorment es realitza el bloqueig amb llet al 5%, 0.3% de Trito X-100 en PBS 0.1M durant 2h a temperatura ambient. Tot seguit, es realitza la incubació amb l'anticòs primari dissolt en la solució de bloqueig durant tota la nit. El dia següent, es realitzen 3 rentats de 10min en 0.1% Trito X-100 en PBS 0.1M. Finalment, s'incuben els talls amb l'anticòs secundari dissolt amb la solució de bloqueig. Posteriorment es realitzen 3 rentats amb 0.3% de Trito X-100 en PBS 0.1M, es posa la solució protectora de fluorescència (Prolog Gold anti-fade, Molecular Probes), es deixa assecar la solució protectora i es poden adquirir imatges al microscopi.

### ***Quantificació de la migració neuronal***

Es van adquirir imatges dels talls que no estan malmesos per l'electroporació amb un microscopi Leica. Es realitzen 10 divisions (bin) des de la VZ fins a la MZ i es fa un recompte de les cèl·lules GFP-positives per a cada bin d'un mateix tall de teixit. Els resultats es presenten com a percentatge de cèl·lules presents a cada divisió. Per l'anàlisi estadístic, es van analitzar els valors obtinguts per cada cervell, Control N=7, ShNcam2 N=7, Ncam2.1 N=1 i Ncam2.2 N=4, amb un test ANOVA amb un posttest de Bonferroni.

## **Espectrometria de masses**

### ***Conjugació de l'anticòs.***

Els anticossos anti-Ncam2 i anti-Ncam2.1 es van conjuguar a les boles magnètiques del kit (Dyneabeads Antibody coating kit, Lifetechnologies). Es van preparar 10 mg de *Dynabeads* per cada condició (control sense anticòs, anticòs anti-Ncam2 i anti-Ncam2.1) utilitzant 5 µg d'anticòs (anti-Ncam2 o anti-Ncam2.1) o BSA en el cas del control (o/n, 37°C, agitació). Els *Dynabeads* conjugats es van resuspendre en tampó SB comercial i es van conservar a 4°C.

### ***Preparació de les mostres***

Del cervell de ratolins P15 es van dissecionar els telencèfals, es van retirant la regió del bulb olfatori. A continuació, es van triturar amb l'homogenitzador (*Polytron*) en tampó hipotònic (Tris 10 mM a pH 7,4, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EGTA 1 mM, còctel *Complete Mini* d'inhibidors de proteases i inhibidors de fosfatases (NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> i Na<sub>2</sub>HP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)). El lisat es va passar a través d'una xeringa amb agulla 27G i es va centrifugar (14.000 rpm 15 min). A continuació, el precipitat es va resuspendre amb Tampó de Lisis (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 1mM EGTA, glicerol al 10% i tritó-x100 al 1%, còctel *Complete Mini* d'inhibidors de proteases i inhibidors de fosfatases (NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> i Na<sub>2</sub>HP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)) i incubar a 4°C 40 min en agitació orbital. Finalment es va centrifugar la mostra (14.000 rpm 10 min), es va fer una dilució 1/10 del sobrenedant i es va rentar 90 min amb proteïna G.

A continuació, es van centrifugar les mostres i va extreure el sobrenedant. Els sobrenadants es van incubar amb 100 µl de *Dynabeads* conjugats (anti-Ncam2 o anti-Ncam2.1) o control, o/n a 4°C i en agitació orbital. El següent dia, es van centrifugar les preparacions 30seg a 13000rpm,

i es van rentar 2-3 vegades amb tampó de lisi i de 2-3 vegades amb tampó Tris 50 mM a pH 7.5. Les mostres es van tractar amb 30 µl d'urea (urea 8M, Tris 50mM a pH 7.5, DTT 60mM) 15 min a temperatura ambient.

### ***Espectrometria de masses***

L'anàlisi de les mostres per espectrometria de masses es va realitzar el servei de Proteòmica dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona. Les mostres es van digerir amb tripsina (2µg per mostra, pH 8, 32,5°C, 16h o/n). El protocol d'identificació de proteïnes de la mostra immunoprecipitada inclou la separació dels pèptids per HPLC de fase inversa (NanoAcquity, Waters) i la posterior injecció a l'espectròmetre Orbitrap Velos (Thermo Scientific), mesurant a una resolució de 60.000 a ràtio m/z de 400 i rang d'adquisició 300-1800 m/z. La recerca es va fer amb Sequest HT contra la base de dades *SwissProt* Mouse i, per optimitzar la cerca, es va utilitzar el programari Percolator. Les proteïnes incloses en les llistes finals són aquelles amb una relació de descobriment fals (FDR) menor o igual al 0.01%.

### ***Co-immunoprecipitació***

Del cervell de ratolins P15 es van dissecionar els telencèfals, retirant la regió del bulb olfatori. A continuació, es van triturar amb l'homogenitzador (*Polytron*) en tampó hipotònic (Tris 10 mM a pH 7,4, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EGTA 1 mM, còctel *Complete Mini* d'inhibidors de proteases i inhibidors de fosfatases (NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> i Na<sub>2</sub>HP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)). El lisat es va passar a través d'una xeringa amb agulla 27G i es va centrifugar (14.000 rpm 15 min). El precipitat es va resuspendre amb Tampó de Lisis (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 1mM EGTA, glicerol al 10% i tritó-x100 al 1%, còctel *Complete Mini* d'inhibidors de proteases i inhibidors de fosfatases (NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> i Na<sub>2</sub>HP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)) i incubar a 4°C 40 min en agitació orbital. Es va centrifugar la mostra (14.000 rpm 10 min), es va fer una dil.1/10 del sobrenedant i es va rentar 90 min amb proteïna G.

Les mostres rentades amb proteïna G es van incubar (o/n, a 4°C i agitació orbital) amb 3 µg d'anticòs primari. El dia següent, es van centrifugar les mostres durant 30sec a 13000rpm. El precipitat de proteïna G es va rentar amb Tampó de Lisis 3 vegades. Les mostres es van resuspendre amb PBS i tampó de càrrega (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 2.15M β-mercaptoetanol, 10% SDS, 30% glicerol, 0.012% blau de bromofenol) i bullir a 95°C durant 10 min. A continuació es va seguir el protocol de "western blot".

### ***Hibridació in situ***

Posteriorment a la dissecció, els cervells dels ratolins en estadi embrionari 15 o estadis post-nats van ser fixats durant tota la nit (o/n). El dia següent es deshidraten els cervells: es van posar de manera seqüencial en solucions d'etanol del 50%, 90% i 100%, i es van incloure en una matriu de parafina. Els cervells es van tallar de manera coronal a 7µm de gruix amb un micròtom (Leica RM 2155), disposant els talls en portaobjectes adhesius. A continuació es pot continuar amb el protocol descrit (La Torre et al., 2015), fent servir les sondes d'interès. Els portaobjectes que contenien els talls de teixit es van escalfar a 68°C durant 2h. Es van realitzar 2 rentats amb xilè i un amb etanol 100%, i es van deixar assecar. Tot seguit, es va afegir 150µL de solució de bloqueig que conté 50% formamida, 10% dextrà sulfat, 5x la solució de Denhardt's, 2% reactiu de bloqueig (Roche), 0.2M NaCl, 10mM Tris-base, 5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5mM EDTA i tRNA de llevat a 1mg/ml, es va deixar en aquesta solució 1h a 68°C.

Posteriorment, es va posar la solució amb les sondes al damunt dels talls, utilitzant una solució amb la mateixa composició que la solució de bloqueig però dissolent les sondes d'interès a una concentració final de 2µg, i es van deixar els portaobjectes a 68°C o/n. El dia següent es va realitzar un rentat d'una hora a 68°C amb solució de rentat 1, 50% formamida, SCC, i 1% SDS i un segon rentat amb la solució de rentat 2, 50% formamida, SCC, i 0.1% Tween. Posteriorment es van realitzar 2 rentats de 10min amb SCC, un rentat a temperatura ambient amb PBS 0.1% Tween, i un bloqueig d'una hora amb PBS 0.1% Tween, 2% reactiu de bloqueig (Roche) i 10% NGS. A continuació es va realitzar la incubació o/n a 4°C de la solució de DIG-AP, PBS 0.1% Tween, 2% reactiu de bloqueig (Roche), 10% NGS i DIG-AP (1:2000) (Roche). El dia següent es van realitzar rentats consecutius durant una hora amb PBS 2% llet i 0.1% de Tween, i 2 rentats de 10min amb la solució NTMT, 0.1 NaCl, 0.1M Tris-base pH 9.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween. Posteriorment es va realitzar la incubació amb la solució de revelat, NTMT i 2% NBT/BCIP. El dia següent es va canviar la solució, incrementant el percentatge de NBT/BCIP fins al 10%. El temps de la incubació en el líquid de revelat és variable; s'atura la reacció fent un rentat amb PBS quan s'observa senyal. Finalment, es va fixar el teixit i la reacció amb PFA 4%, es va rentar amb aigua destil·lada i es va posar el cobreobjectes amb Fluoromount G.

## **Virus**

### ***Producció de virus***

Per la producció de lentivirus es planten  $6 \cdot 10^6$  cèl·lules 293FT en plaques de 10cm de diàmetre i es deixen a l'incubador O/N. El següent dia es prepara la solució de DNA amb 10µg dels plasmidis lentivirals (pWPI/pWPI-Ncam2.1/pWPI-Ncam2.2/ShCnt/ ShNcam2), 2.5 µg del vector VSVg i 7.5 µg del vector pCMV delta R.8.2 en 900 µL d'aigua MiliQ i 100µL CaCl<sub>2</sub>. Aquesta solució es barreja amb 1mL de 2xHBSS pH7.5, i s'afegeix la solució final al medi de cultiu de cel·lular gota a gota. Al cap de 4h es realitzen 2 rentats amb PBS i es posa medi de les cèl·lules 293FT. Passades 72h, es recull el medi que conté els virus i es centrifuga per eliminar els detritus 5min a 1500rpm. El sobrenedant es filtra amb filtres de 0.45µm (Frisenette ApS), i el filtrat s'ultracentrifuga a 26000rpm a 4°C. El precipitat es resuspen amb 40µL de PBS i es realitzen alíquotes de 5µL cadascuna, que es guarden a -80°C. La titulació mínima obtinguda per poder utilitzar els virus és de  $1 \cdot 10^6$  unitats de virus per µL.

### ***Injeccions de virus***

Pels experiments de determinació de la funció de Ncam2 *in vivo* es van injectar virus a la regió de l'hipocamp de mascles de 8 setmanes d'edat. Es va seguir el protocol descrit en (Teixeira et al., 2012). Les agulles de vidre es van estirar i formar utilitzant el Puller(Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter instrument).

Primer es van anestesiar els mascles i es van col·locar en l'estereotaxi. Posteriorment es va realitzar un tall a la pell i el teixit conjuntiu de damunt del crani. A continuació, es va realitzar un forat amb un trepant. El forat del crani coincideix amb les coordenades necessàries per realitzar la injecció. Pel forat s'introdueix l'agulla de vidre a través de la qual s'injecten els lentivirus. Les coordenades per CA1 són: -2.0, 1.6, ±1.6, i pel gir dentat són: 3.5, 2.1, ±3.8 respecte Bregma. Es van injectar 1.5µL de la dissolució de virus per hipocamp, a una velocitat d'injecció de 0.2 µL/min. Posteriorment a la injecció, es va deixar l'agulla de vidre durant 5min a les coordenades de la injecció. A continuació es va retirar l'agulla amb precaució, i es tancar el tall de la pell i teixit conjuntiu amb grapes quirúrgiques. Després de 30 dies es van perfondre

els animals seguint el protocol descrit a l'apartat de preparació de teixit neuronal. El teixit es va processar per immunocitofluorescència o DAB. Les imatges es van adquirir en un microscopi LEICA SP2 o E800.

### ***Quantificació de les espines dendrítiques i els botons sinàptics***

En el cas de les espines es va comptar el nombre d'espines en un segment de la dendrita marcada utilitzant un microscopi de camp clar. En el cas del comptatge de les dendrites de les neurones de la CA1 es va quantificar el nombre d'espines en un segment de 15µm. En el cas de les neurones granulars es va quantificar la densitat d'espines en un segment de 20µm de la zona externa de la capa molecular.

En el cas dels botons sinàptics es va quantificar les protuberàncies després de fer una superposició de les imatges adquirides en el SP2. El nombre de protuberàncies es va dividir per la longitud del tram axonal analitzat.

Els comptatges es presenten per mitjana d'animal, entre 2 i 3 animals per grup experimental. Per l'anàlisi estadístic, aquests valors es van analitzar amb un test-t per comparar els diferents grups.

### **Obtenció de mostres per Western blot**

En el cas de processar mostres per realitzar deteccions de la proteïna Ncam2 per western-blot s'utilitza la següent solució de lisi: Tris-Base (2-Amino-2-hidroximetil-propà-1,3-diol) 125mM, 2% SDS (dodecilsulfat sòdic) pH 6.8. En cas de cultius cel·lulars, la solució s'escalfa a 95°C i s'aplica damunt de les cèl·lules en cultius. En cas de teixit neuronal, es posa el teixit en l'ependorf que conté la dissolució en calent. Posteriorment, es recullen les mostres i s'escalfen a 95°C durant 5min. A continuació, es repeteix per triplicat el procediment de congelació amb gel sec i descongelació amb un bany de 45°C, de durada de 5 i 2 min, respectivament. Es soniquen les mostres durant 30seg amb cicles de 0.5 i amplitud del 80%. Posteriorment es centrifuguen les mostres a 12.000 rpm durant 5min i es recull el sobrenedant.

### ***Western blot***

Les mostres obtingudes mitjançant els diferents procediments es mesclen amb el tampó de carrega (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 2.15M β-mercaptoetanol, 10% SDS, 30% glicerol, 0.012% blau de bromofenol) en proporció 5:1, i s'escalfen a 95°C durant 5 min. Posteriorment les mostres es transfereixen al gel d'electroforesi SDS-PAGE amb un percentatge de poliacrilamida concret que permeti una millor separació de les proteïnes. En el cas dels gels que en els quals volíem detectar les isoformes de Ncam2 utilitzàvem gels amb un percentatge de poliacrilamida del 6%. Posteriorment, s'aplica un diferència de potencial amb un tampó (Tris 0.25M pH 8.5, glicina 1.92M i 0.1% SDS). Quan les proteïnes ja es troben separades es transfereixen del gel a la membrana de nitrocel·lulosa amb un sistema de transferència humida (120mM Tris pH 8.5, 125 mM glicina i 20% metanol). A continuació les membranes s'incuben amb solució de bloqueig, generalment llet al 5% en TBS-Tween, 10mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl i 0.1% Tween. Posteriorment, s'incuben les membranes durant 2h amb l'anticòs primari dissolt en TBS-Tween. Després es renten les membranes 3 vegades amb TBS-Tween, i s'incuben 2h amb l'anticòs secundari corresponent conjugat amb HRP. Per visualitzar la senyal es va utilitzar el sistema de revelat ECL i films fotogràfics FUJI.

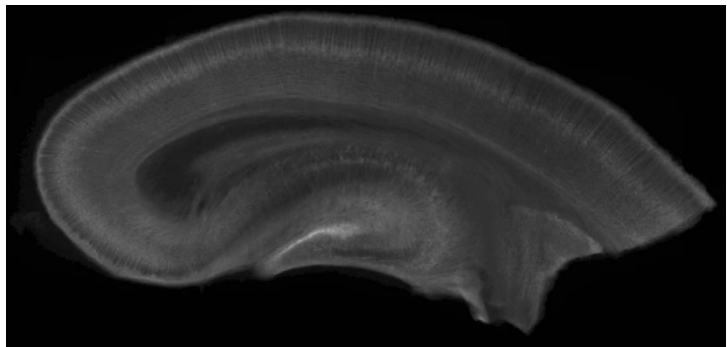
# Resultats





## Capítol 1

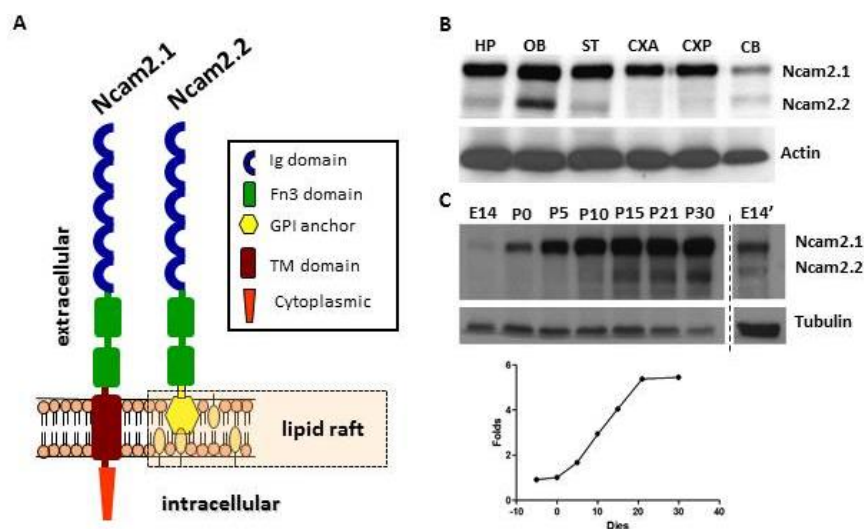
### L'expressió de Ncam2 en el sistema nerviós



## 1.1 Ncam2 s'expressa en el telencèfal des del desenvolupament

Un dels objectius de la tesi és determinar els patrons d'expressió de Ncam2. En estudis previs, l'expressió de Ncam2 s'havia estudiat en cervell, però no de manera detallada (Paoloni-Giacobino et al., 1997; Yoshihara et al., 1997). El nostre objectiu és caracteritzar l'expressió a nivell d'ARNm i de proteïna, ja que les neurones són cèl·lules amb projeccions molt distals respecte el soma i, a més a més, les proteïnes d'adhesió es poden acumular en regions concretes de la neurona. D'aquesta manera, l'aboradatge experimental ens permet identificar on s'expressa i on s'acumula Ncam2.

Ncam2 presenta dues isoformes; la isoforma transmembrana, Ncam2.1, i la isoforma ancorada a membrana, Ncam2.2 (**figura R.1.1.A**). En cervells adults de ratolí, les dues isoformes són presents a nivell proteic en totes les regions que s'han analitzat (**figura R.1.1.B**). Les dues isoformes estan presents, però la proporció d'aquestes és diferent segons la regió. La isoforma Ncam2.1 presenta uns nivells similars en totes les regions. La forma ancorada, en canvi, és més abundant en el bulb olfatori i poc abundant en al còrtex. Es coneix que Ncam2.1 és més abundant que Ncam2.2 degut a la inestabilitat intrínseca de l'ARNm de Ncam2.2 (Yoshihara et al., 1997). En concret, ens vam focalitzar en l'expressió en l'hipocamp i el còrtex (**figura R.1.1.C**). Al desenvolupament neuronal, les dues isoformes són presents des d'estadis embrionaris. En concret, Ncam2.1 és la isoforma més abundant. Els resultats mostren que Ncam2 és present en estadis embrionaris, incrementa la seva presència al llarg dels estadis postnats i es manté estable en cervell adult.



**Figura R.1.1. Expressió de Ncam2 en el cervell del ratolí.**

A) Esquema representatiu de les dues isoformes de Ncam2. Les dues isoformes presenten un mateix domini extracel·lular amb 5 dominis Immunoglobulina (Ig domain) i 2 dominis fibronectina (Fn3 domain). La isoforma Ncam2.1 presenta un domini transmembrana (TM domain) i una cua citosòlica (Cytoplasmic), la isoforma Ncam2.2 es troba ancorada a la membrana a través d'un ancoratge glicosilfosfatidilinositol (GPI anchor). B) Presència de les dues isoformes de Ncam2 en cervell adult de ratolí. Es detecta senyal en les diferents regions del cervell adult, 4 mesos d'edat. C) Presència de les dues isoformes de Ncam2 en el telencèfal del ratolí al llarg del temps i representació de l'augment relatiu de la isoforma Ncam2.1 al llarg del temps des d'estadis embrionaris 14, E14, fins a postnats 30, P30. Es detecta senyal de les dues isoformes de Ncam2, Ncam2.1 (125KDa) i Ncam2.2 (100KDa). Al costat dret hi ha un carril, E14' (carril E14 amb una major exposició). Com a control de càrrega s'utilitza la tubulina. La gràfica mostra l'augment relatiu de la isoforma Ncam2.1 al llarg del desenvolupament. La senyal està normalitzada utilitzant com a referència la senyal a dia postnatal 0. Abreviacions: E, embrionari; P, postnatal; HP, hipocamp; OB, bulb olfatori; ST, cos estriat; CXA, còrtex anterior; CXP, còrtex posterior; CB, cerebel.

## 1.2 Detecció de l'ARNm de Ncam2.1 en desenvolupament

Per determinar quines cèl·lules expressen Ncam2 ens vam focalitzar en detectar l'ARNm de Ncam2.1, donat que Ncam2.2 és més inestable. En concret, vam realitzar hibridacions *in situ* a estadis embrionaris E15.5 i postnats 0 amb una sonda específica per la isoforma Ncam2.1. **(figura R.1.2).**

En l'estadi embrionari E15,5 s'observa senyal a les diferents zones:

- **Zona anterior del cervell (figura R.1.2.A.I):** s'observa l'expressió en el bulb olfatori. Les regions amb més intensitat són les cèl·lules mitrals del bulb (Mi), l'òrgan vomeronasal (VNO) i totes les capes ectoturbinades (Ecto) i endotubinades (Endo) de la cavitat nasal.
- **Telencèfal (figura R.1.2.A.II):** s'observa senyal al còrtex (CX) i l'hipocamp (HI) en formació. També s'observa senyal a la placa de la zona basal del telencèfal (btp) i una senyal més dèbil a la zona caudal del putamen (CPu), el futur estriat.
- **Zones posteriors del cervell (figura R.1.2.A.III):** S'observa una senyal més intensa a la regió dels progenitors de les neurones Purkinje del cerebel (Pk). També hi ha senyal al col·licle superior.

En l'estadi postnatal 0 **(figura R.1.2.B)**, s'observa senyal en moltes regions del còrtex: el parietal (Par), el cingulat (Cg) i el piriforme (Ent). A més a més, detectem expressió en regions més ventrals, com, per exemple l'estriat, el tàlem, l'amígdala o l'hipotàlem.

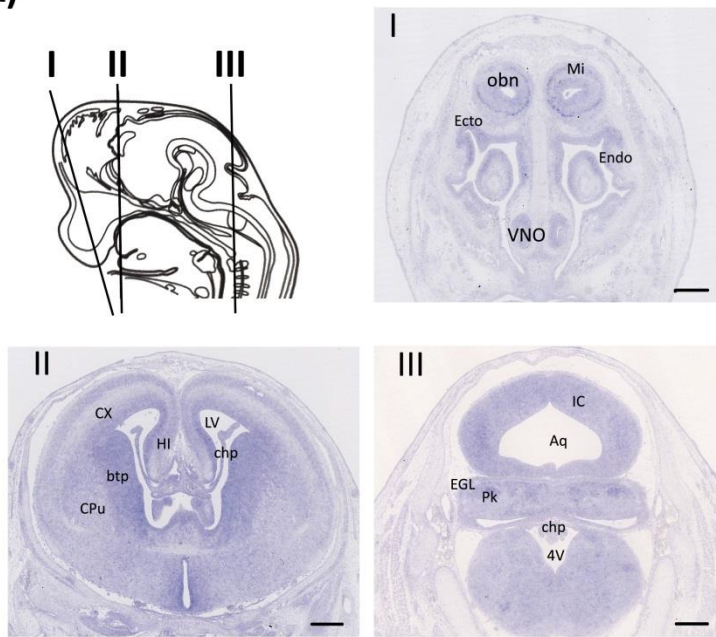
En el còrtex i l'hipocamp **(figura R.1.2.C)**, en l'estadi embrionari E15.5 observem senyal a la regions de neurogenèsi, VZ i a la SVZ. En l'hipocamp, s'observa expressió tant al neuroepiteli (HNE), que dona lloc la CA, com al neuroepiteli (DNE), que genera el DG. Tenint en compte que també detectem senyal a la zona basal del telencèfal, Ncam2.1 s'expressa en les regions de neurogenèsi tant de les interneurons com de neurones piramidals. A més a més al còrtex, es detecta l'expressió a la placa cortical (CP). En aquest estadi de desenvolupament es posicionen les neurones de les capes V i VI.

En postnatal P0, al còrtex parietal observem una senyal molt intensa a la zona de la capa V, però a les altres capes la senyal és més dèbil. Convé ressaltar que aquestes neurones presenten un soma molt més gran i tenen major grau de diferenciació que les neurones que s'estan posicionant en les capes superiors.

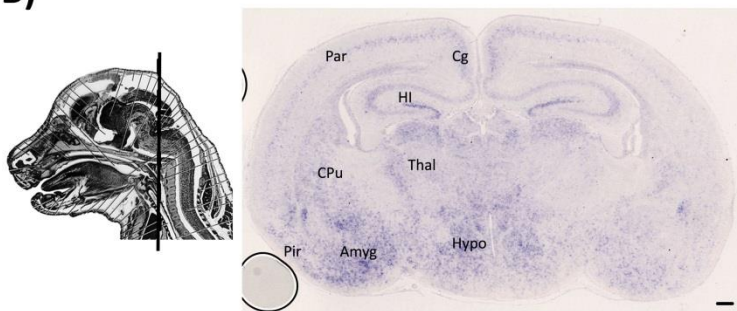
A l'hipocamp, la senyal és present en totes les regions, però és més intensa a la zona del gir dentat (DG) en formació. En aquesta regió trobem una elevada neurogenèsi i migració neuronal per formar la capa supra-piramidal. A nivell de morfogènesi neuronal, les capes CA1 i CA3 presenten una major diferenciació que el DG. També trobem senyal per sota la capa de cèl·lules de la CA3, que podria correspondre a les cèl·lules que migren des de la zona del DNE cap al gir en formació.

Per tant, Ncam2.1 s'expressa en les zones de proliferació neuronal del cerebel, del còrtex i de l'hipocamp. Posteriorment, s'expressa en les neurones post-mitòtiques de diferents regions del cervell durant la diferenciació i maduració neuronal.

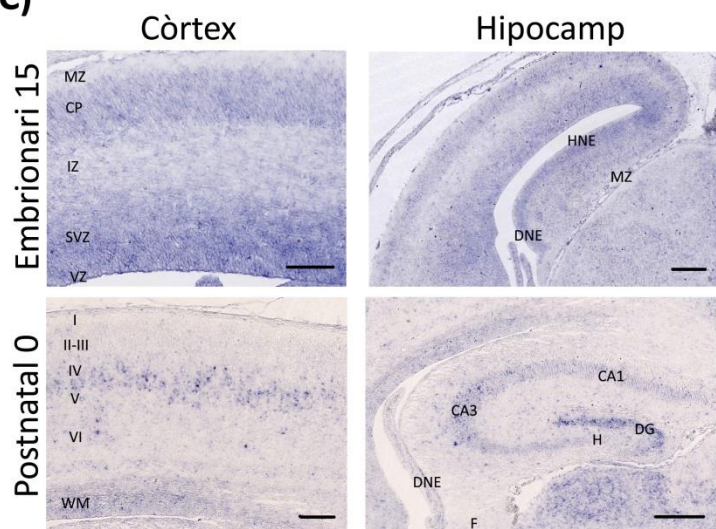
A)



B)



C)



**Figura R.1.2. Expressió de Ncam2.1 en el desenvolupament.**

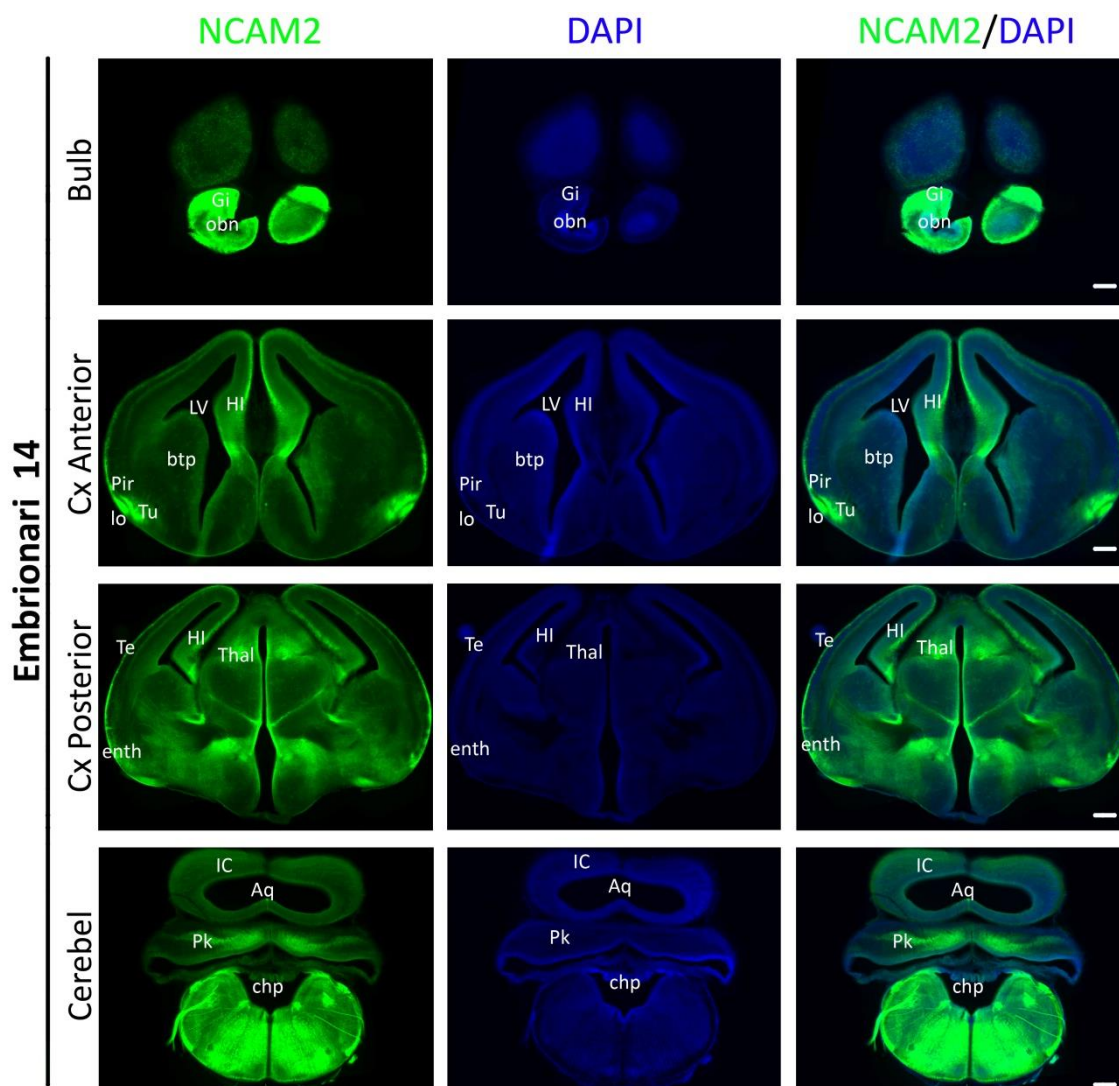
Expressió de Ncam2.1 en l'embrió de ratolins, A) i en cervell postnatal 0, B). Senyal produïda per la sonda específica pel ARNm de Ncam2.1 en diferents seccions coronals de ratolí en estadi embrionari 15 o en estadi postnatal 0. Les diferents seccions utilitzades es marquen en l'esquema del cervell de ratolí. C) Comparació de l'expressió de Ncam2.1 en còrtex i hipocamp en estadi embrionari 15 i postnatal 0. Barra d'escala 200µm.

Abreviacions: Amyg, Amígdala; Aq, aquaducte cerebral; btp, placa basal del telencèfal; CA, cornus ammonus; Cg, còrtex cingulat; chp, plexus choroideus; CP, placa cortical; CPu, caudat putamen; CX, còrtex; Ecto, capa ectoturbinada; DG, gir dentat; DNE, neuroepiteli dentat; EGL, capa germinal externa; Endo, capa endotubinada; EPI, capa externa plexiforma; H, hilus; HI, hipocamp; HNE, neuroepiteli de l'hipocamp; Hypo, hipotàlam; IC, col·licle inferior; IZ, zona intermèdia; LV, ventricle lateral; MZ, zona marginal; Par, escorça parietal; Pk, neuroepiteli de les cèl·lules Purkinje; Pir, còrtex piriforme; Thal, Tàlem; SVZ, zona subventricular; VNO, òrgan vomeronasal; VZ, zona ventricular; WM, substància blanca; I-VI, capes del còrtex. 4V, quart ventricle.

### 1.3 Patró d'expressió de la proteïna Ncam2 en cervell

A nivell proteic, es va realitzar immunohistofluorescència per tal de caracteritzar el patró de la senyal de Ncam2 durant el desenvolupament neuronal.

- **Embrionari 14 (figura R.1.3).** Al bulb olfatori detectem Ncam2. Segons la distribució i el tipus de senyal correspondria als axons que projecten els glomèruls i dendrites de les cèl·lules mitrals. A la zona del telencèfal en formació, detectem senyal de Ncam2 al còrtex i a l'hipocamp, en la VZ i SVZ, la MZ i la zona de preplaca. La senyal no es homogènia a tot el còrtex en formació; és més intensa al còrtex piriforme, còrtex entorínic i la zona que donarà lloc al còrtex cingulat. A més a més, s'observa una senyal molt intensa en les projeccions olfatives laterals (Io) i tubercle olfatiu (Tu). Aquestes senyals correspondrien als axons de les cèl·lules mitrals que projecten els axons al còrtex sensorial. A la zones més posteriors del cervell, detectem senyal a la zona del neuroepiteli del cerebel, on es generen les neurones Purkinje.



**Figura R.1.3. Patró d'expressió proteic de Ncam2, embrionari 14.**

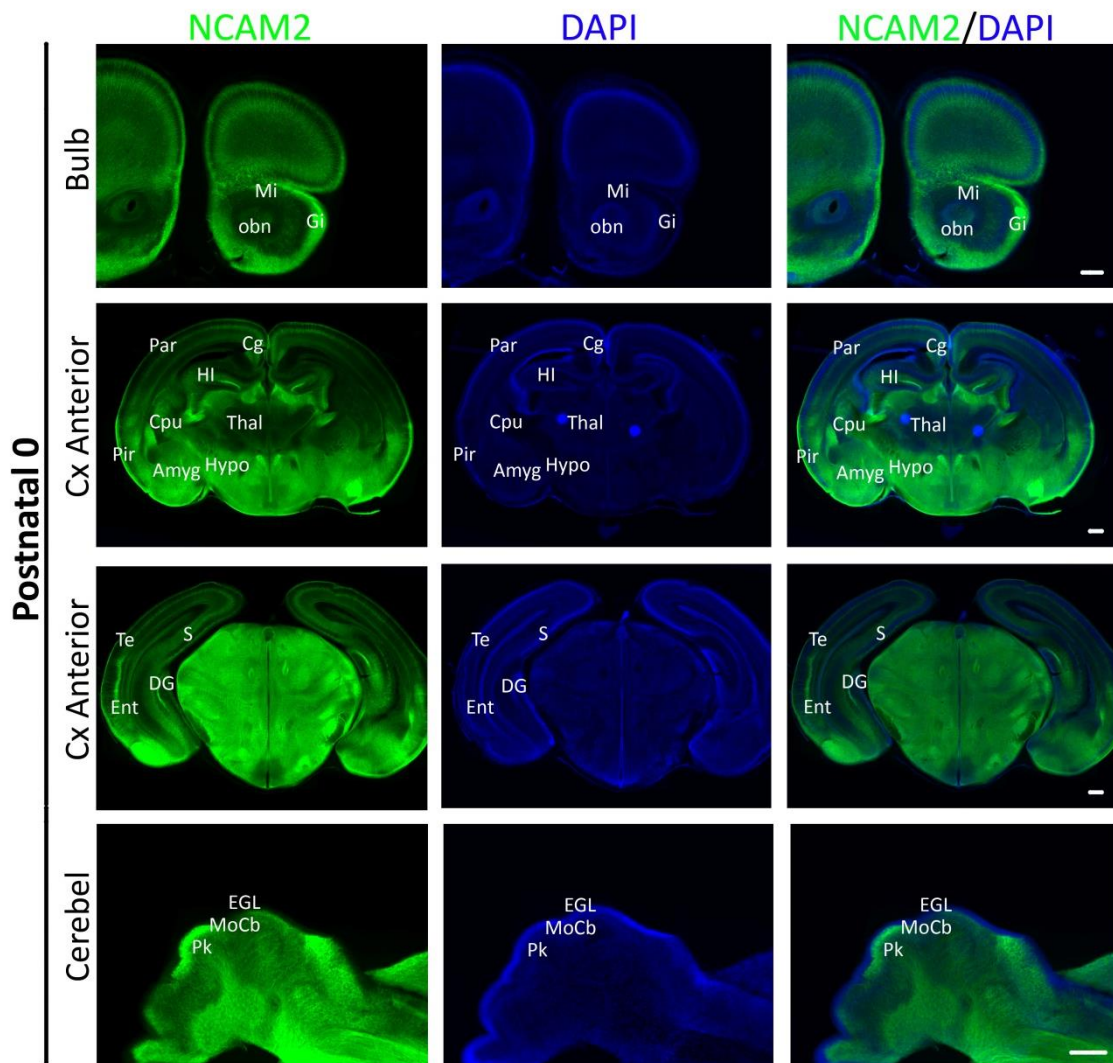
Immunohistofluorescència detectant les dues isoformes de Ncam2 en talls coronals de cervells de ratolins en estadi embrionari 14. Per a visualitzar els nuclis cel·lulars de les regions del cervell s'ha realitzat la co-tinció amb DAPI. Barra d'escala 200µm

Abreviacions: Amyg, Amígdala; Aq, aquaducte cerebral; btp, placa basal del telencèfal; Cg, circumvolució del cíngol; Cg, circumvolució del cíngol; CP, placa cortical; CPU, cós estriat; Cx, còrtex; DG, gir dentat; EGL, capa germinal externa; Enth, escorça entorínica; Gi, capa glomerular; HI, hipocamp; Hypo; hipotàlam; IC, col·lícle inferior; LV, ventricle lateral; Mi, cèl·lules mitrals; MoCb, capa molecular del cerebel; MZ, zona marginal; obn, neuroepiteli del bulb olfatori; Par, escorça parietal; Pir, còrtex piriforme; Pk, neuroepiteli de les cèl·lules Purkinje; ; Te, còrtex temporal; Tu, tubercle olfatiu; Thal, Tàlem; S, subicle.

- **Postnatal 0 (figura R.1.4).** Al bulb olfatori continua la senyal dels axons que projecten a la zona dels glomèruls en formació.

En altres regions del telencèfal, Ncam2 es detecta a tot el còrtex i l'hipocamp. Tot i així, continua la diferència de senyal entre regions del còrtex: la senyal més intensa s'observa en el piriforme i l'entorínic. La senyal es detecta en la capa I i les capes intermèdies. A més a més, detectem senyal a tota la formació hipocàmica: l'hipocamp, el subicle i l'escorça entorínica. A les zones ventrals també es detecta Ncam2, com per exemple, el talem, hipotàlem o el cos estriat.

A les zona del cerebel en formació, la senyal de Ncam2 correspon a les cèl·lules Purkinje i als seus axons que comencen a projectar.

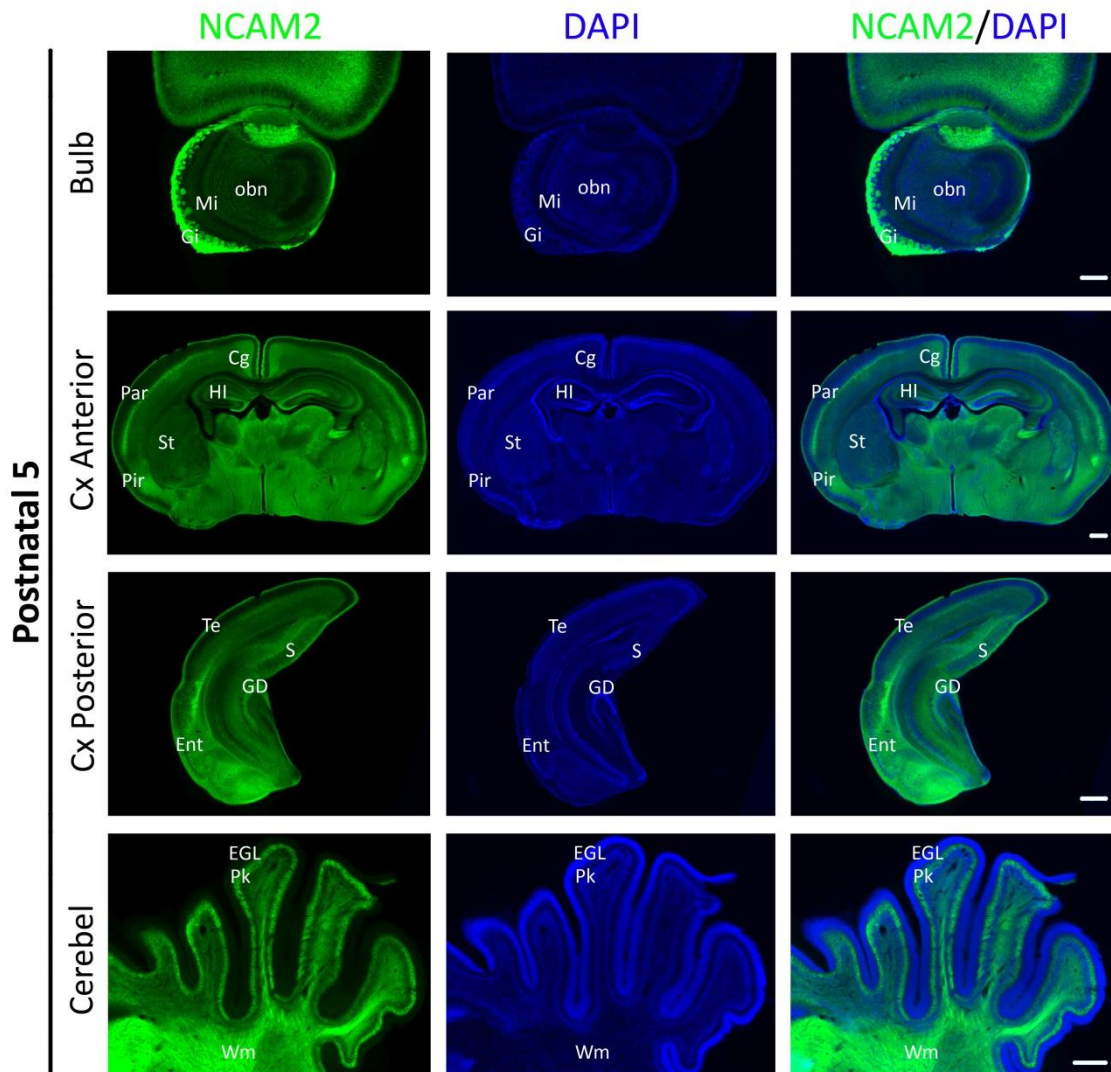


**Figura R.1.4. Patró d'expressió proteic de Ncam2, postnatal 0.**

Immunohistofluorescència detectant les dues isoformes de Ncam2 en talls coronals de cervells de ratolins en estadi postnatal 0. Per a visualitzar els nuclis cel·lulars de les regions del cervell s'ha realitzat la co-tinció DAPI. Barra d'escala 200µm

Abreviacions: Amyg, Amígdala; Aq, aquaducte cerebral; btp, placa basal del telencèfal; Cg, circumvolució del cíngol; chp, plexus choroideus; CP, placa cortical; CPu, cós estriat; Cx, còrtex; DG, gir dentat; EGL, capa germinal externa; Enth, escorça entorínica; Gi, capa glomerular; HI, hipocamp; Hypo; hipotàlem; IC, col·licle inferior; LV, ventricle lateral; Mi, cel·lules mitrals; MoCb, capa molecular del cerebel; MZ, zona marginal; obn, neuroepiteli del bulb olfatori; Par, escorça parietal; Pir, còrtex piriforme; Pk, neuroepiteli de les cèl·lules Purkinje; ; Te, còrtex temporal; Tu, tubercle olfatiu; Thal, Tàlem; S, subicle.

• **Postnatal 5 (figura R.1.5).** Al bulb olfatori la senyal és molt intensa en la zona dels glomèruls i és més dispersa a les fibres que projectarien a les zones del còrtex sensorial. Al telencèfal, continuen les diferències d'intensitat, com en el còrtex periantal o entorínic. Tot i això, les diferents regions del còrtex tenen senyal de Ncam2. Aquesta senyal també és present en la formació hipocàmpica: l'hipocamp, el subicle i l'escorça entorínica. A la zona del diencèfal es continua detectant senyal, com per exemple, al talem i a l'hipotalem. A la zona del cos estriat també s'observa senyal de les fibres que creuen. Al cerebel, s'observa una senyal molt intensa que coincideix amb la zona dels somes de les cèl·lules Purkinje. La senyal s'estén al llarg dels axons en la substància blanca i en la dendrita en direcció a la capa molecular. Les cèl·lules granulars, en canvi, no expressen Ncam2.



**Figura R.1.5. Patró d'expressió proteic de Ncam2, postnatal 5.**

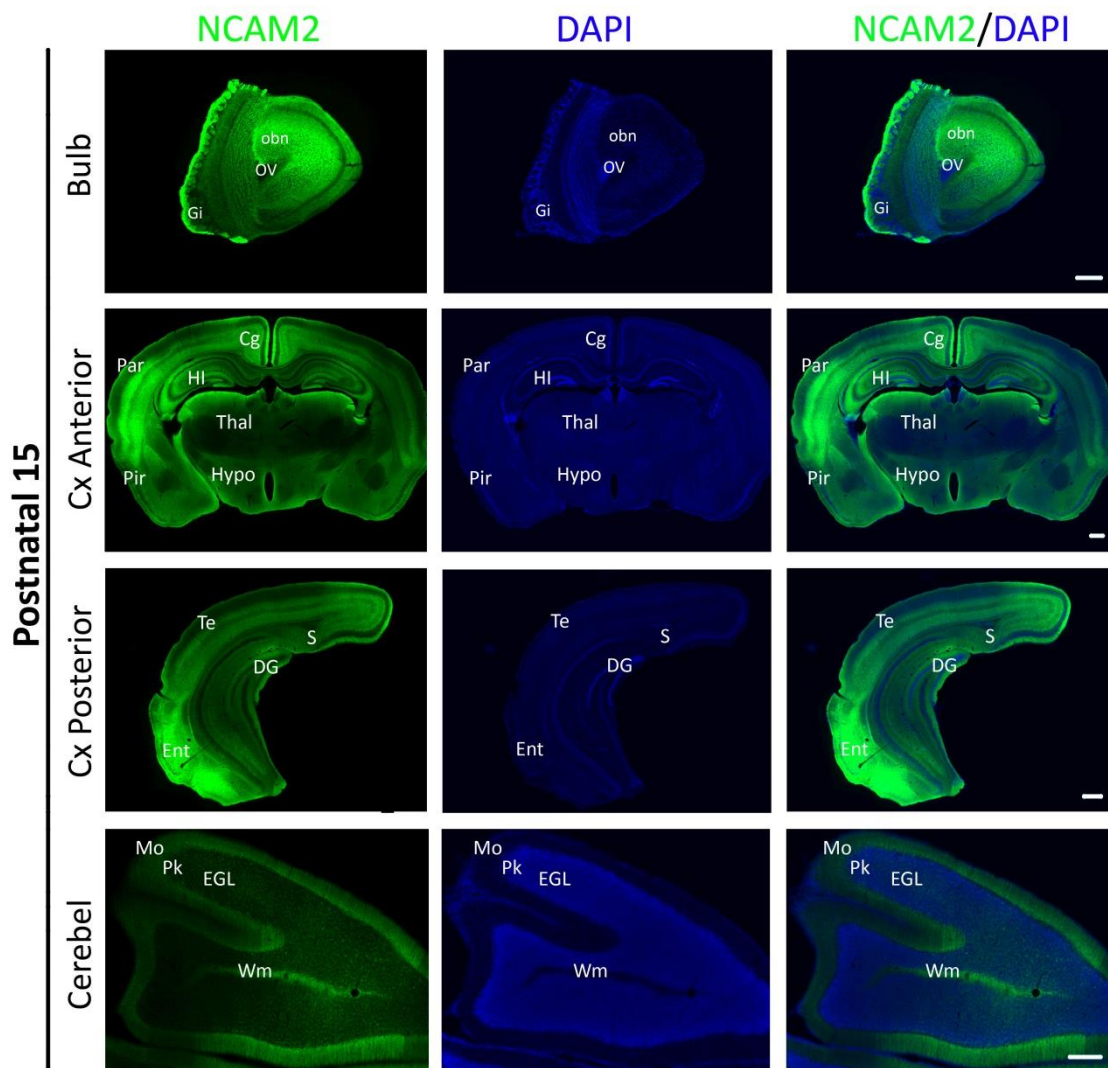
Immunohistofluorescència detectant les dues isoformes de Ncam2 en talls coronals de cervells de ratolins en estadi postnatal 5. Per a visualitzar els nuclis cel·lulars de les regions del cervell s'ha realitzat la co-tinció DAPI. Barra d'escala 200µm.

Abreviacions: Amyg, Amígdala; Aq, aquaducte cerebral; btp, placa basal del telencèfal; Cg, circumvolució del cíngol; chp, plexus choroideu; CP, placa cortical; CPu, cós estriat; Cx, còrtex; DG, gir dentat; EGL, capa germinal externa; Enth, escorça entorínica; Gi, capa glomerular; HI, hipocamp, Hypo; hipotalem; IC, col·licle inferior; LV, ventricle lateral; Mi, cel·lules mitrals; MoCb, capa molecular del cerebel; MZ, zona marginal; obn, neuroepiteli del bulb olfatori; Par, escorça parietal; Pir, còrtex piriforme; Pk, neuroepiteli de les cèl·lules Purkinje; ; Te, còrtex temporal; Tu, tubercle olfactiu; Thal, Tàlem; S, subicle



- Postnatal 15 (figura R.1.6).** Al bulb olfatori detectem la senyal en els glomèruls i podem apreciar el marcatge diferencial segons la posició, fenotip prèviament descrit (Yoshihara et al., 1997). Al còrtex es continuen apreciats diferents intensitats al llarg de les diferents regions del còrtex, però la senyal es més homogènia entre capes. A les regions més ventrals s'observa senyal en hipotàlem i més dèbil en talem.

En la zona del cerebel, detectem senyal a la zona molecular i la substància blanca, on hi ha els arbres dendrítics i els axons de les Purkinje, respectivament. En concret, la senyal de l'arbre dendrític de les Purkinje no és homogeni, trobem diferències d'intensitat entre les regions. La senyal ja no és present als somes i s'ha difós al llarg de tot l'arbre dendrític. En aquesta regió, també s'observa una senyal dèbil a la zona granular.



**Figura R.1.6. Patró d'expressió proteic de Ncam2, postnatal 15.**

Immunohistofluorecència detectant les dues isoformes de Ncam2 en talls coronals de cervells de ratolins en estadi postnatal 15. Per a visualitzar els nuclis cel·lulars de les regions del cervell s'ha realitzat la co-tinció DAPI. Barra d'escala 200µm pel bulb i cerebel i 500µm pel còrtex.

Abreviacions: Amyg, Amígdala; Aq, aquaducte cerebral; btp, placa basal del telencèfal; Cg, circumvolució del cíngol; chp, plexus choroideus; CP, placa cortical; CPU, cós estriat; Cx, còrtex; DG, gir dentat; EGL, capa germinal externa; Enth, escorça entorínica; Gi, capa glomerular; HI, hipocamp; Hypo; hipotàlem; IC, col·licle inferior; LV, ventricle lateral; Mi, cel·lules mitrals; MoCb, capa molecular del cerebel; MZ, zona marginal; obn, neuroepiteli del bulb olfatori; Par, escorça parietal; Pir, còrtex piriforme; Pk, neuroepiteli de les cèl·lules Purkinje; ; Te, còrtex temporal; Tu, tubercle olfactiu; Thal, Tàlem; S, subicle.

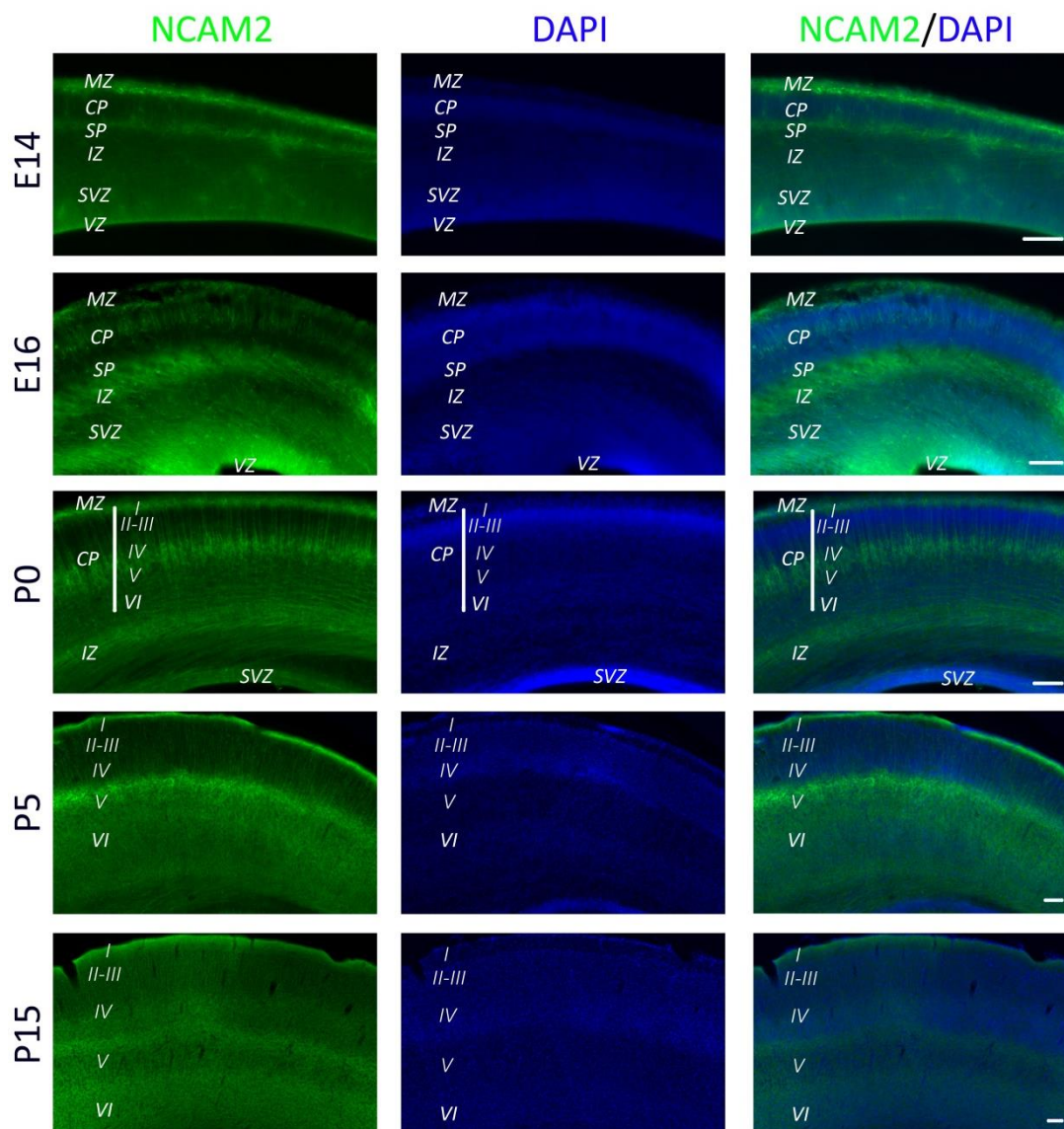
## 1.4 Patró proteic de Ncam2 durant el desenvolupament en còrtex i hipocamp

Centrant-nos en les regions de l'hipocamp i el còrtex durant el desenvolupament, el patró d'expressió de Ncam2 és el següent:

- **Còrtex (Figura R.1.7):** En estadis embrionaris primerencs, E14, s'observa senyal tènue a la VZ i la SVZ. La senyal de Ncam2, en canvi, és més intensa a la zona de la MZ i en la SP.

A E16, trobem una senyal més intensa a la SVZ i la VZ, s'observa alguna cèl·lula marcada al llarg de la migració. Detectem una senyal molt intensa en la IZ, CP i la MZ.

En estadis postnatais 0, la senyal més intensa es concentra en les capes més profundes V i VI i la capa I (MZ). En aquest sentit, les neurones de la capa V desenvolupen la seva dendrita apical cap a la MZ, s'observa una marca molt intensa de Ncam2 en aquesta dendrita apical i la zona pròxima del soma. A més a més, els axons que surten de la capa cortical i entren a la IZ també presenten marca. En estadis posteriors, P5 i P15, de forma gradual la senyal de Ncam2 es torna més homogènia al llarg del còrtex. Trobem senyal en totes les capes del còrtex, tot i que és més intensa a les zones més profundes i la capa I.



**Figura R.1.7. Patró d'expressió proteic de Ncam2 durant la formació del còrtex.**

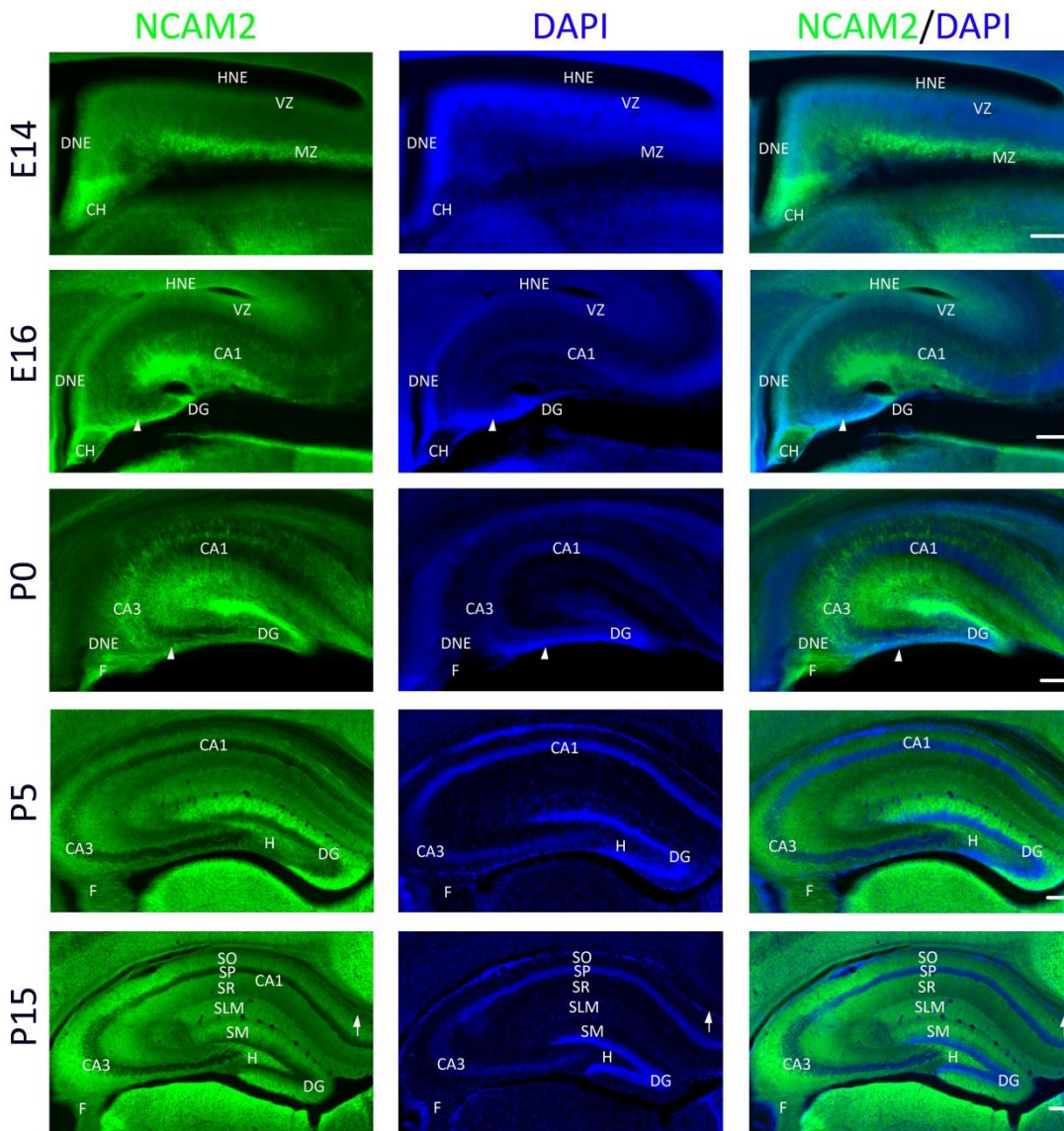
Immunohistofluorescència detectant les dues isoformes de Ncam2 en còrtex de ratolins al llarg del temps. Per a visualitzar els nuclis cel·lulars de les regions del cervell s'ha realitzat la co-tinció DAPI. Barra d'escala 100µm.

Abreviacions: CP, placa cortical; IZ, zona intermèdia; MZ, zona marginal; SP, subplaca; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular; I-VI, capes del còrtex.

- **Hipocamp (Figura R.1.8):** En estadis embrionaris primerencs, E14, la senyal de Ncam2 és molt forta a la MZ. També es detecta de forma dèbil a la zones de proliferació, com HNE, i DNE.

A E16, la senyal a la zona de proliferació és més intensa. S'observa senyal a la zona de proliferació del gir dentat i també a la zona de migració tangencial (marcada amb un cap de fletxa) fins al gir en formació. A més a més, la senyal és molt intensa a la MZ de la CA.

En l'estadi postnatal 0, les neurones de la CA estan posicionades i comencen a desenvolupar l'arbre dendrític i els axons. Observem senyal al llarg d'aquestes projeccions i al voltant del soma. En concret, alguns dels axons projecten a través de la fimbria, regió on detectem senyal. El gir dentat, en canvi, encara s'està formant, i detectem una senyal molt intensa en aquesta regió. S'observa una senyal dèbil en tota la via migratòria des del DNE fins al DG.



**Figura R.1.8. Patró d'expressió proteic de Ncam2 durant la formació de l'hipocamp.**

Immunohistofluorescència detectant les dues isoformes de Ncam2 en hipocamp de ratolins. Per a visualitzar els nuclis cel·lulars de les regions del cervell s'ha realitzat la co-tinció DAPI. Barra d'escala 100µm. Els caps de fletxes senyalen les neurones granulars que migren des del DNE cap a la zona del DG. La fletxa mostra les fibres del cos callós.

Abreviacions: CA, cornus ammonis; CH, hem cortical; DG, gir dentat; DNE, neuroepiteli dentat; F, fimbria; H, hilus; HNE, neuroepiteli de l'hipocamp; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; SLM, stratum lacunosum-moleculare; SL, stratum lucidum; SM, stratum moleculare; MZ, zona marginal; VZ, zona ventricular.

En l'estadi P5, detectem senyal en tot l'hipocamp, però és més intensa en les dendrites en formació de la capa granular del gir dentat. A més a més, els axons d'aquestes neurones, les fibres molsoses, també presenten una senyal intensa en la zona del hilus i la zona de la CA3 en forma de fibres. A P15, la senyal de Ncam2 és present en tot l'hipocamp. Cal destacar les neurones granulars del DG, que mantenen la marca a les dendrites i als axons que projecten a la CA3. S'observa una senyal intensa als *stratum moleculare*, del DG, i *stratum lacunosum moleculare*, de la CA1. Aquestes capes reben els axons de la via perforant de l'escorça entorínica. En concret, aquesta regió del còrtex presenta una senyal intensa de Ncam2 al llarg de tot el desenvolupament. També presenten marca de Ncam2 les fibres comissurals en la fímbria i els axons que creuen el cos callós (marcats amb unes fletxes).

En resum, l'expressió i la senyal de Ncam2 incrementen al llarg del desenvolupament i es mantenen en cervell adult. Aquesta senyal no augmenta de forma homogènia, sinó que l'expressió és diferent entre regions i capes del cervell. En aquest sentit, les regions d'interès en la tesi, el còrtex i l'hipocamp, tenen una quantitat de Ncam2 que varia segons l'estadi des desenvolupament i la regió d'estudi.

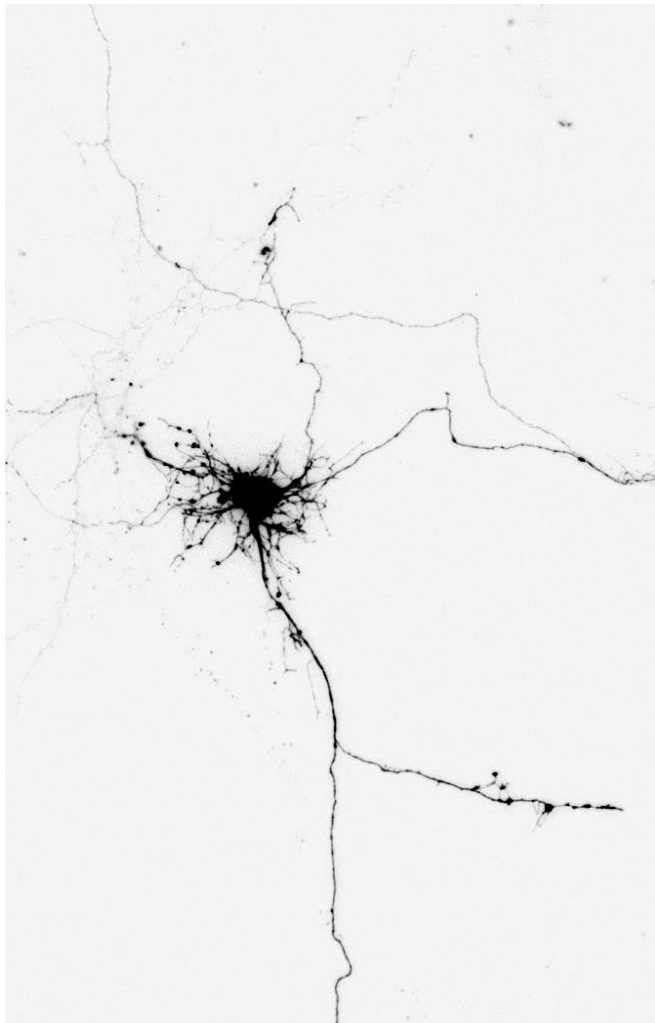
A nivell de neurogènesi, Ncam2 es localitza en les zones on es generen les neurones glutamatèrgiques i les interneurones.

A nivell de localització cel·lular, Ncam2 s'acumula en el soma i les zones pròximes en els estadis primerencs del desenvolupament. En estadis més avançats, en canvi, s'observa de forma més difusa en tota la neurona, excepte al soma. Així doncs, es produeix un canvi de la localització al llarg del desenvolupament neuronal.



## Capítol 2

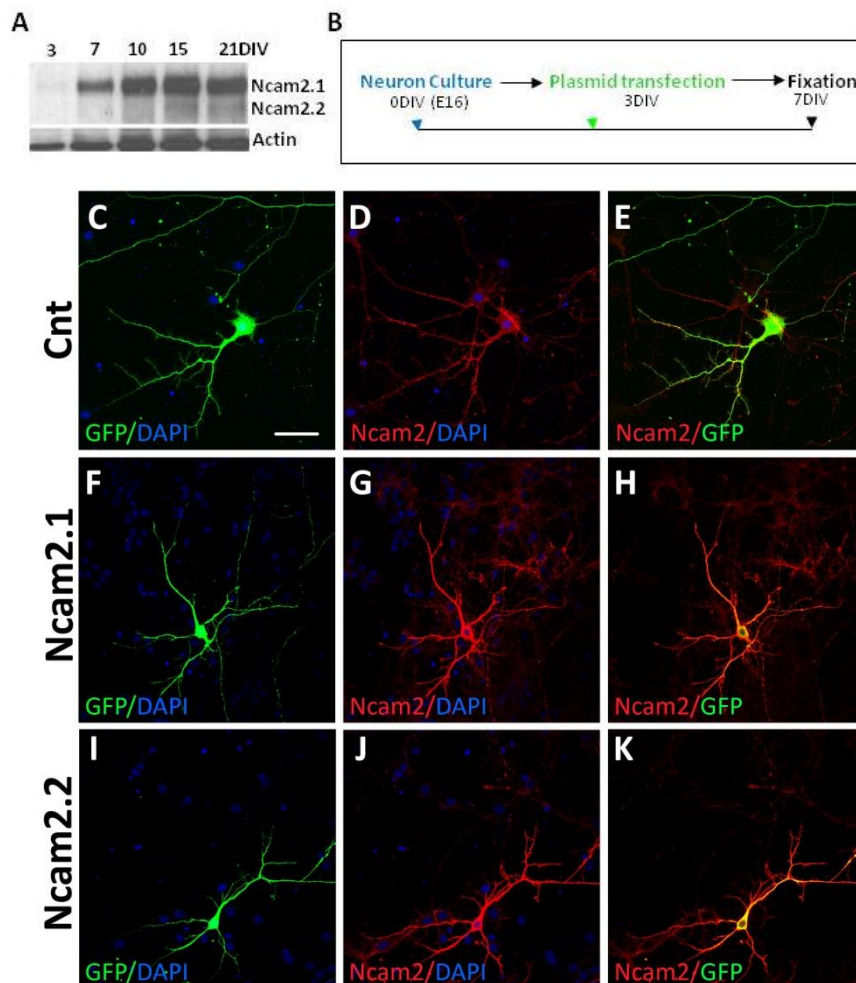
### El paper de Ncam2 en la polarització neuronal i la formació de l'arbre dendrític i axonal *in vitro*



## 2.1 Ncam2 s'expressa en neurones embrionàries d'hipocamp *in vitro* i la seva sobreexpressió afecta a la longitud de les dendrites

Hem observat que Ncam2 s'expressa a tot el telencèfal durant el desenvolupament neuronal. En concret, es detecta en les dendrites i els axons en formació. En aquest sentit, la seva funció durant el desenvolupament s'ha estudiat, sobretot, en el bulb olfatori, on participa en el desenvolupament i formació dels axons i dendrites (von Campenhausen et al., 1997; Yoshihara et al., 1997). Per altra banda, tot i que detectem una elevada expressió en hipocamp i còrtex, la seva funció és encara molt desconeguda.

Un dels objectius de la tesi és determinar la funció de Ncam2 en la morfogènesi de les neurones hipocampals; concretament, estudiar el paper de Ncam2 en el desenvolupament de l'arbre dendrític i el terminal axonal. Per respondre aquesta qüestió hem utilitzat cultius neuronals hipocampals. Primer es van analitzar els nivells de Ncam2 en cultius embrionaris d'hipocamp de ratolins (**figura R.2.1.A**). Durant l'evolució dels cultius *in vitro*, s'observa un increment en els nivells de Ncam2 semblants als observats *in vivo* (**figura R.1.1**). La isoforma Ncam2.1 és més abundant en estadis inicials i posteriorment s'observa senyal de Ncam2.2. Per tant, a nivell *in vitro*, es pot reproduir l'expressió de Ncam2 i, d'aquesta manera, es poden utilitzar els cultius hipocampals com a model d'estudi de la morfogènesi neuronal.



**Figura R.2.1. L'expressió de Ncam2 en cultius hipocampals embrionaris en neurones controls i neurones modificades.**

A) Nivells de Ncam2 en cultius embrionaris hipocampals *in vitro*. Els nombres representen els dies de cultiu (days *in vitro*, DIV comptats des del dia que es van cultivar, que correspon a 0DIV) .B) Esquema representatiu de l'abordatge experimental per estudiar l'efecte de Ncam2 en l'estadi 4 de Banker. Pels cultius hipocampals s'utilitzen cervells de ratolins embrionaris E16, la transfecció es realitza a dia 3 i es fixa a 7DIV. C- K) imatges de immunofluorescència detectant Ncam2 en neurones controls (C-E), amb sobreexpressió de Ncam2.1 (F-H) i sobreexpressió de Ncam2.2 (I-K). Per visualitzar les neurones transfectades s'ha realitzat una immunodetecció de GFP. Per a visualitzar els nuclis cel·lulars s'ha realitzat la co-tinció DAPI. La barra d'escala són 50µm.

Vam analitzar l'estadi 4 de Banker, en el qual es desenvolupen les dendrites i s'elonga el terminal axonal (**figura R.2.1.B**). Utilitzant aquest abordatge vam modular l'expressió de Ncam2.

En el cas de la sobreexpressió de Ncam2, es va dissenyar i comprovar l'expressió específica de les dues isoformes de Ncam2 (**figura R.2.1.C-K**). La senyal de Ncam2 en les neurones control està present al llarg de tota la neurona, en dendrites i axó (**figura R.2.1.C-E**). Per tant, Ncam2 no s'acumula de forma diferencial en cultius *in vitro*. Tanmateix, la sobreexpressió produeix un increment dels nivells de Ncam2 a membrana, però tampoc modifica la distribució (**figura R.2.1.F-K**).

A continuació, es va analitzar l'efecte de la sobreexpressió de Ncam2 en el desenvolupament de l'arbre dendrític (**figura R.2.2**). Les primeres observacions posen de manifest que la sobreexpressió de Ncam2.1 o Ncam2.2 no altera el desenvolupament de les dendrites i l'axó. Tot i això, els anàlisis quantitius revelen que la sobreexpressió de Ncam2 produeix alguns canvis en el desenvolupament dendrític:

- **Ncam2.1:** les neurones que presenten una sobreexpressió de Ncam2.1 tenen un arbre dendrític igual que els controls i un nombre similar de dendrites primàries. La disminució en el nombre de dendrites no és significativa.

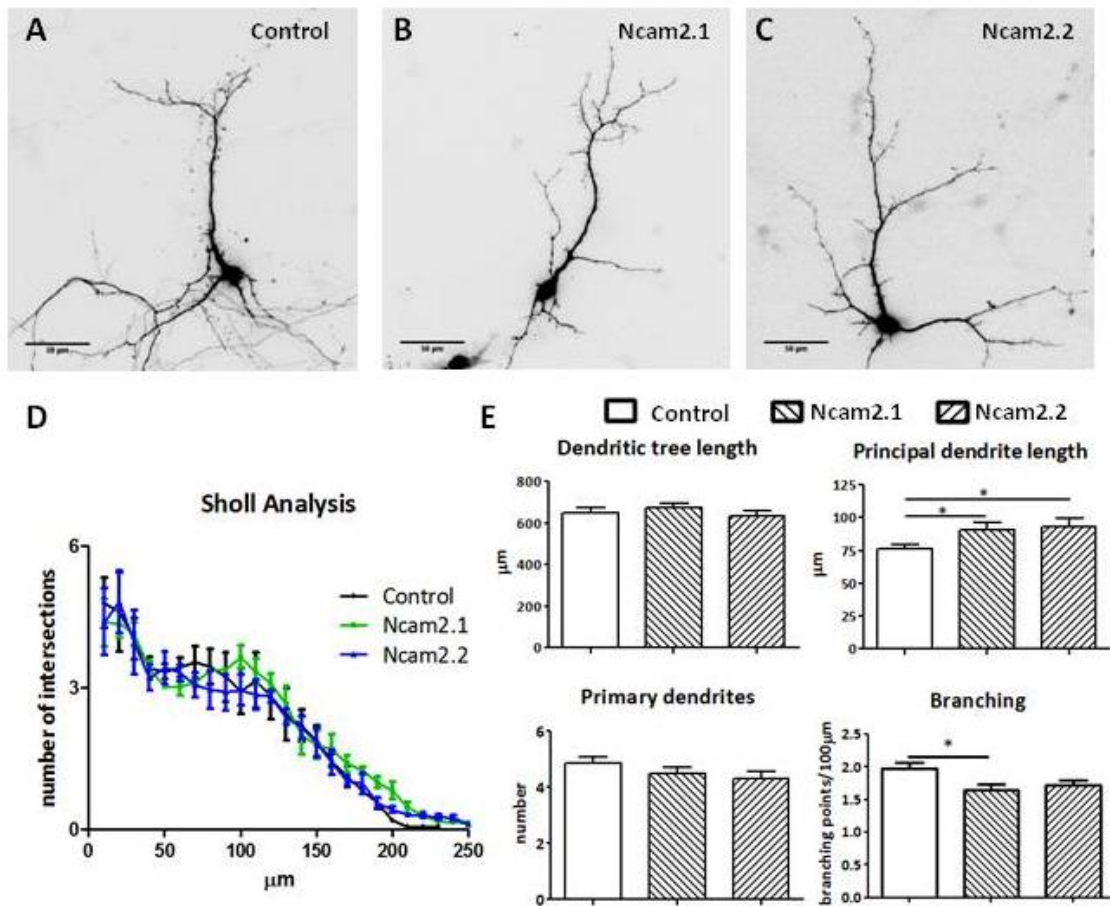
La sobreexpressió de Ncam2.1 produeix canvis significatius en la longitud de la dendrita principal i els punts de ramificació. Amb el paràmetre de longitud de dendrita principal ens referim a la distància entre l'inici de la dendrita en el soma fins a l'extrem més distal. En concret, s'incrementa la longitud d'aquesta dendrita un 20% i es redueixen els punts de ramificació un 17% respecte el control.

- **Ncam2.2:** les neurones que presenten una sobreexpressió de Ncam2.2 tampoc presenten canvis en el nombre de dendrites primàries i de longitud total de l'arbre dendrític, tot i que presenten una tendència a la disminució en el nombre de dendrites. La sobreexpressió de Ncam2.2 produeix un canvi de forma significativa en la longitud de la dendrita principal, incrementant-la un 22% respecte el control.

A més a més, també es van realitzar anàlisis de Sholl dels arbres dendrítics (**figura R.2.2.D**). L'anàlisi Sholl serveix per mesurar la complexitat de l'arbre dendrític. Es representen les interseccions que creuen una circumferència imaginària a una determinada distància del soma de la neurona. En situacions controls s'observa que les interseccions disminueixen fins a uns 50-60µm, perquè hi ha les dendrites primàries. A continuació, es produeix un augment o manteniment de les interseccions degut a les ramificacions. Finalment, es produeix una disminució de les interseccions, ja que les dendrites no són madures i no estan ramificades als extrems, presentant un menor grau de complexitat. En cultius madurs de neurones els perfils de Sholl són diferents. En aquest sentit, la sobreexpressió de les isoformes de Ncam2 per separat no produeixen canvis en els diagrames de Sholl.

D'aquesta manera, la sobreexpressió de les dues isoformes de Ncam2 per separat produeix canvis subtils en la morfologia de la neurona, incrementant la longitud de la dendrita principal i reduint la ramificació en el cas de la sobreexpressió de Ncam2.1.



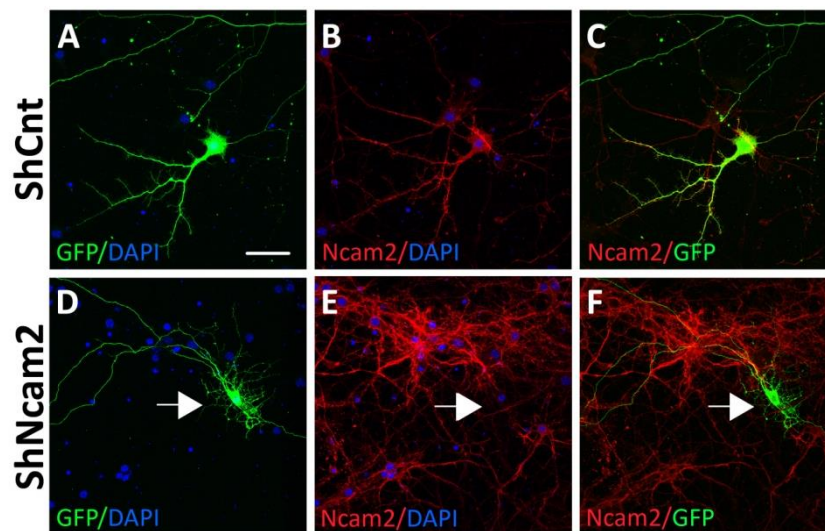


**Figura R.2.2. L'efecte de la sobreexpressió de Ncam2 en cultius *in vitro*.**

A-C) Imatges representatives de les neurones transfectades amb els diferents plasmidis, control, sobreexpressió de Ncam2.1 i Ncam2.2 cotransfectades amb GFP. Per visualitzar les neurones transfectades es realitza una immunodetecció de GFP. La barra d'escala és de 50 µm. D) Anàlisi Sholl de les diferents condicions experimentals, es representen les interseccions per distància. E) Diferents paràmetres experimentals mesurats en les diferents condicions; control, sobreexpressió de Ncam2.1 i sobreexpressió de Ncam2.2 (d'esquerra a dreta i de dalt a baix): longitud total de l'arbre dendrític (representat en µm), longitud de la dendrita principal (representat en µm), número de dendrites primaries, i ramificacions (representat com punts de ramificació per 100µm). Les dades estan presentades com la mitjana ± SEM; ANOVA Turkey's post hoc test; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

## 2.2 El dèficit de Ncam2 provoca un desenvolupament neuronal aberrant

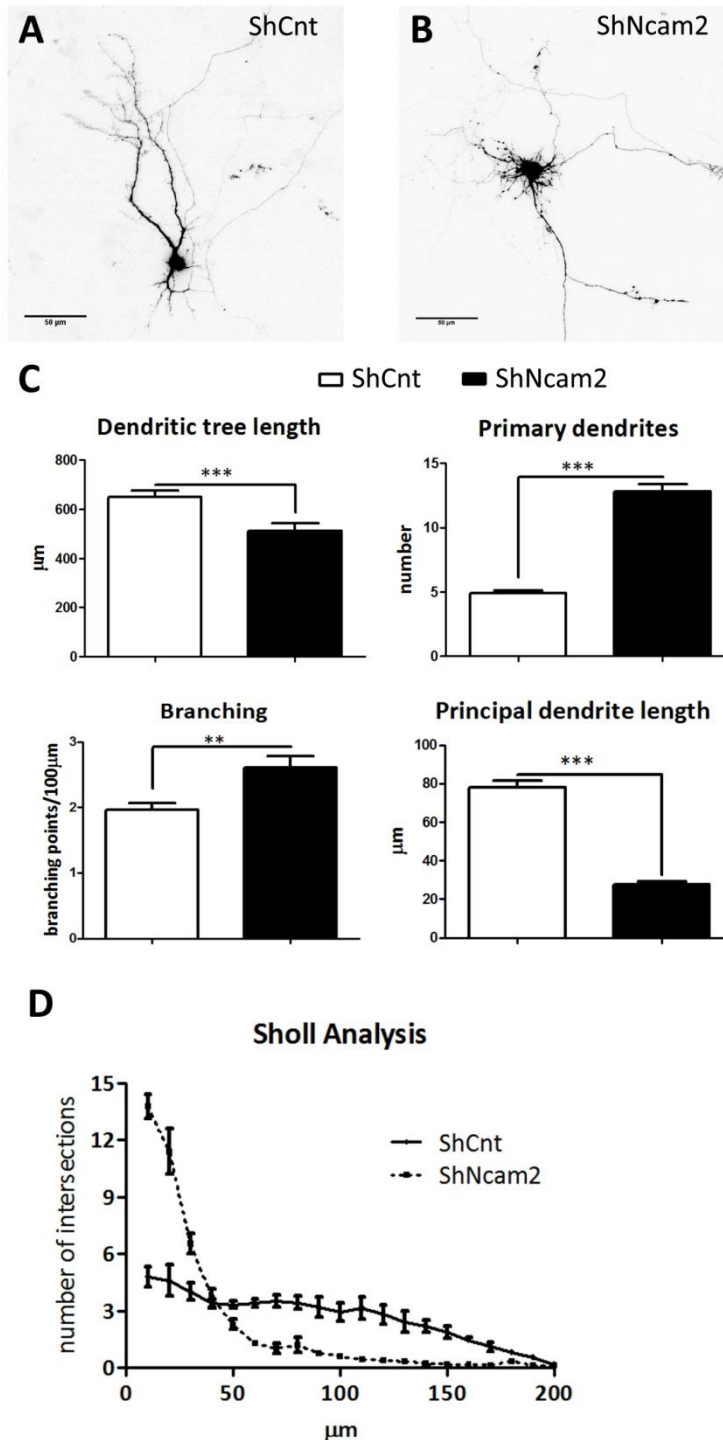
Durant el desenvolupament *in vivo* i *in vitro* es produeix una expressió elevada de Ncam2. Per determinar l'efecte del dèficit de Ncam2 s'ha dissenyat i testat un ShRNA específic de Ncam2, ShNcam2. Aquest ShRNA s'uneix a la regió homologa del ARNm de les dues isoformes de Ncam2. D'aquesta manera, aconseguim silenciar les dues isoformes de Ncam2 en neurones (**figura R.2.3**) i en cèl·lules 293T (**figura R.2.6.B**). Seguint l'abordatge dels experiments anteriors, observem que les neurones transfectades amb el ShNcam2 tenen una disminució de la senyal de Ncam2 després de 4 dies posttransfecció respecte a les neurones controls (**figura R.2.3 D-F**). Com a control s'utilitza un ShRNA amb una seqüència a l'atzar que s'ha comprovat que no afecta els nivells de Ncam2 (**figura R.2.3 i R.2.6.B**).



**Figura R.2.3.** L'expressió de Ncam2 en neurones transfectades amb els ShRNAs. Imatges de immunofluorescència detectant Ncam2 en neurones controls, ShCnt (A-C) i amb dèficit de Ncam2, ShNcam2 (D-F). Per visualitzar les neurones transfectades s'ha realitzat una immunodetecció de GFP. Per a visualitzar els nuclis cel·lulars s'ha realitzat la co-tinció DAPI. La barra d'escala són 50µm.

El fet més sorprenent és el fenotip de l'arbre dendrític. El dèficit de Ncam2 produeix problemes en la polarització neuronal, donant lloc a un arbre dendrític aberrant (**figures R.2.3 i R.2.4**). Aquest dèficit genera un arbre dendrític totalment desestructurat. En concret, tots els paràmetres analitzats en les neurones amb dèficit de Ncam2 són significativament diferents del control (**figures R.2.4.C**). El dèficit de Ncam2 produeix una reducció de l'arbre dendrític del 22% respecte el control. El nombre de prolongacions que surten del soma, que es podrien atribuir a dendrites, és 2.5 vegades superior el del control. La longitud mitjana màxima de les dendrites principals es veu reduïda un 65%, i les ramificacions incrementades un 32%, respecte el control.

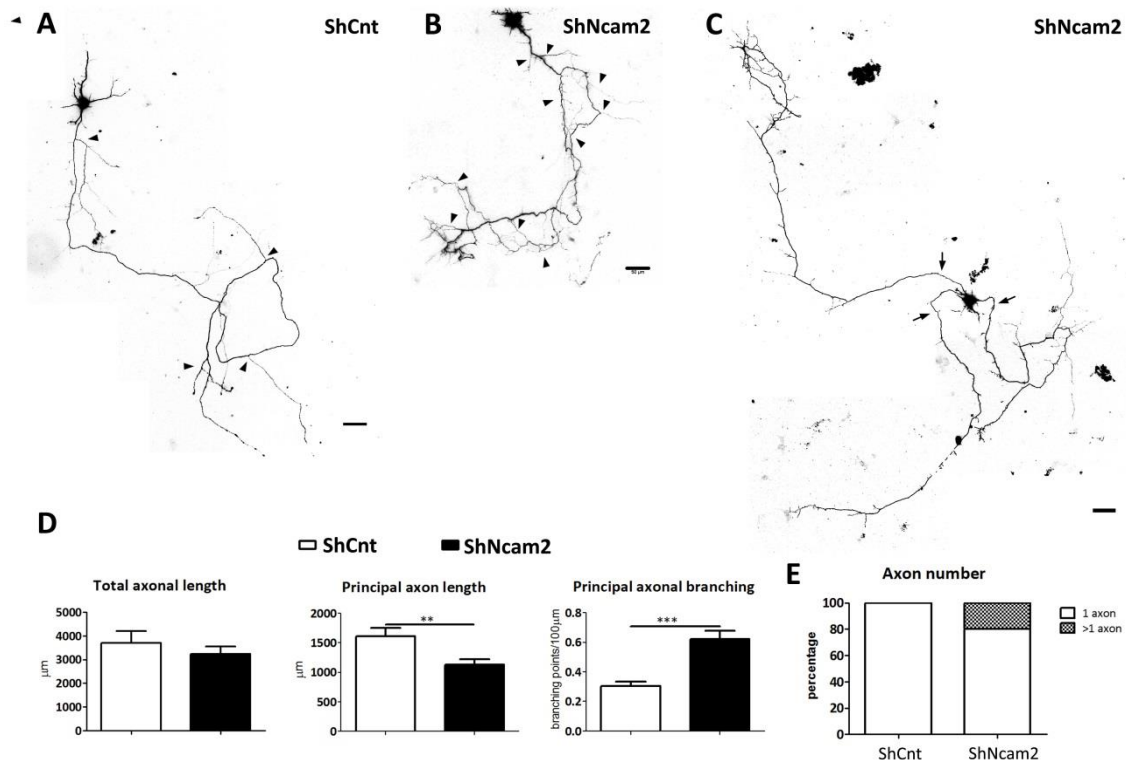
A nivell morfològic, les prolongacions que surten del soma són molt fines i curtes, com reflecteix l'anàlisi Sholl (**figura R.2.4.C**). El nombre d'interseccions a les zones pròximes al soma és molt elevat. Fins i tot, en alguns casos és difícil determinar quin és l'axó de la neurona transfectada, ja que s'observen dues prolongacions allargades que surten de la neurona (**figura R.2.5**).



**Figura R.2.4. Efecte del dèficit de Ncam2 en cultius *in vitro*.**

A i B) Imatges representatives de les neurones transfectades amb el ShRNA control, ShCnt, i el ShRNA per Ncam2, ShNcam2. C) Diferents paràmetres experimentals mesurats en les diferents condicions; control (ShCnt) i silenciament (ShNcam2) de Ncam2.1. Per visualitzar les neurones transfectades es realitza una immunodetecció de GFP. Els diferents paràmetres analitzats són (d'esquerra a dreta i de dalt a baix): longitud total de l'arbre dendrític (representat en µm), longitud de la dendrita principal (representat en µm), ramificacions (representat com punts de ramificació per 100µm) i número de dendrites. Les dades estan presentades com la mitjana ± SEM; t-test; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. D) Diagrama de Sholl de les diferents condicions experimentals. Es representen el nombre d'interseccions respecte la distància

A més a més, el dèficit de Ncam2 produeix un canvi fenotípic important a nivell axonal (**figura R.2.5**). El silenciament de Ncam2 produeix errors greus en la polarització neuronal, que es reflecteixen en l'aparició de dos axons en un 20% de les neurones analitzades (**figura R.2.5.C i E**). A més a més, el dèficit de Ncam2 també produeix canvis en el desenvolupament de l'axó en les neurones que presenten un únic axó principal (**figura R.2.5.A, B i D**). En aquest casos, l'absència de Ncam2 produeix una disminució de la longitud de l'axó del 30% i augmenta el 110% els punts de ramificació del axó. La longitud total de l'arbre de l'axó no es veu afectada. Això ens indicaria un augment de la inestabilitat del citoesquelet de microtúbuls.



**Figura R.2.5.** Efecte del silenciament de Ncam2 sobre el creixement axonal en cultius *in vitro*.

A, B i C, Imatges de neurones embrionàries hipocampals transfectades amb els diferents plasmidis, amb el mateix abordatge que la figura R2.1.A. Per visualitzar les neurones transfectades es realitza una immunodetecció de GFP. Els caps de fletxes marquen les ramificacions en les imatges A i B. Les fletxes de la imatge C mostren els diferents axons que surten de la neurona. La barra d'escala representa 50μm. D, Diferents paràmetres experimentals mesurats en les condicions; ShCnt i ShNcam2, (d'esquerra a dreta): longitud total de l'axó (representat en μm), punts de ramificació en l'axó principal (representat com punts de ramificació per 100μm) i longitud de l'axó principal (representat en μm). E, quantificació del percentatge de neurones que presenten més d'un axó en les dues condicions experimentals diferents. Les dades estan presentades com la mitjana ± SEM; t-test; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Els resultats ens indiquen que Ncam2 és una molècula clau en la polarització i la morfogènesi neuronal *in vitro*. La pèrdua de les dues isoformes de Ncam2 en cultius embrionaris hipocampals produeix canvis severos a la morfologia neuronal, tant a nivell dendrític com a nivell axonal.

### 2.3 Ncam2.1 és essencial per la formació de l'arbre dendrític

El ShNcam2 utilitzat aconsegueix silenciar les dues isoformes. La sobreexpressió, en canvi, és específica d'isoforma, però de forma endògena les neurones expressen les dues isoformes de Ncam2. Per aquest motiu, el següent pas va ser determinar la funció específica de cada una de les isoformes en la recuperació del fenotip observat amb el silenciament de Ncam2. Ens vam centrar en la formació de l'arbre dendrític, ja que era el fenotip més sever. D'aquesta manera, podem determinar quina isoforma està involucrada en la formació de l'arbre dendrític.

Primer, es van dissenyar les formes mutades de les dues isoformes de Ncam2.1 i Ncam2.2, Ncam2.1Mt i Ncam2.2Mt, respectivament (**figura R.2.6.A**). Tot seguit, es va testar l'eficàcia dels constructes generats (**figura R.2.6.B**).

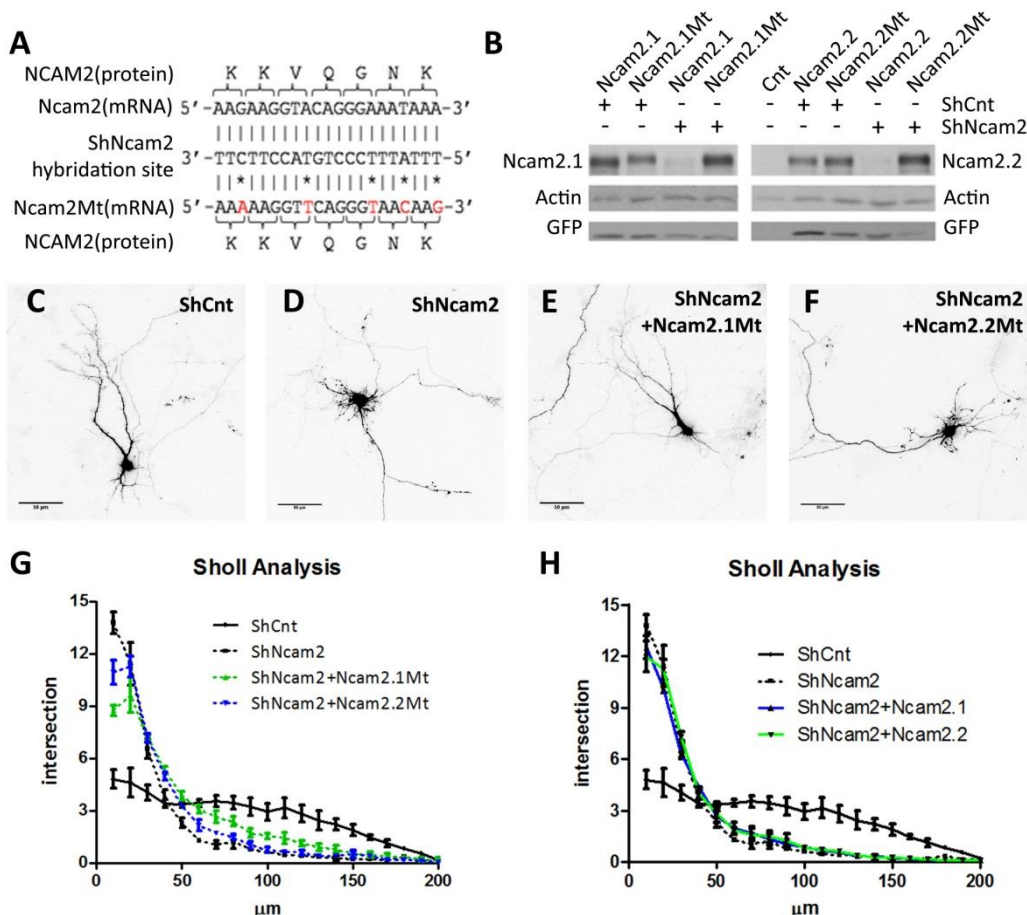
Els resultats indiquen que la sobreexpressió de Ncam2.1 rescata parcialment el fenotip de l'arbre dendrític observat en les neurones que presenten un silenciament de Ncam2 (**figura R.2.6**).

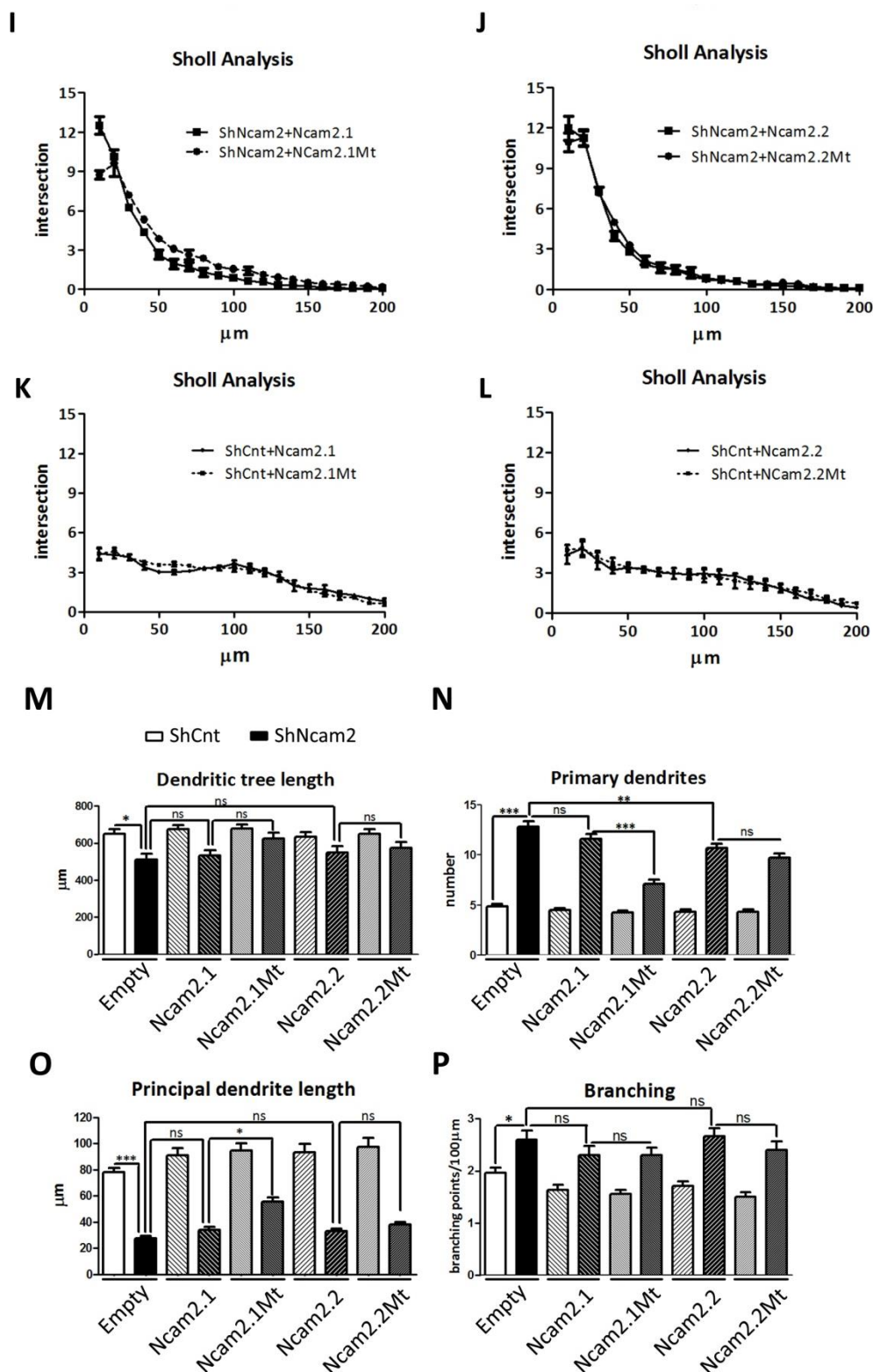
A nivell morfològic, s'observa un rescat del fenotip de l'arbre aberrant en les neurones cotransfectades amb el vector Ncam2.1Mt i el ShNcam2, rescat de la isoforma Ncam2.1 (**figura R.2.6.E**). Aquestes neurones tenen una disminució del nombre de dendrites que surten del soma, i presenten una morfologia semblant al control (**figura R.2.6.C**). En les neurones cotransfectades de Ncam2.2Mt i ShNcam2, el rescat de la isoforma Ncam2.2, no s'observa aquest canvi (**figura R.2.6.F**).

Aquestes observacions es confirmen amb els diferents diagrames de Sholl (**figura R.2.6.G-L**). En el cas del rescat de la isoforma Ncam2.1 i Ncam2.2 (**figura R.2.6.G**), la corba d'interseccions només es veu modificada quan tenim una sobreexpressió de Ncam2.1Mt, però no tenim un rescat total de la morfologia neuronal. El punt inicial (ShNcam2+ Ncam2.1Mt) és significativament inferior al silenciàt (ShNcam2), i la corba presenta major nombre d'interseccions entre el tram de 50 a 150µm. Això implica unes dendrites més llargues i ramificades. El rescat de Ncam2.2 (Ncam2.2Mt), en canvi, no produeix aquests canvis.

La sobreexpressió de les diferents isoformes no mutades no efecten el diagrama de Sholl (**figura R.2.6.H**). A més a més, l'efecte és específic del rescat de l'expressió de Ncam2.1 produïda per la introducció de les mutacions (**figura R.2.6.I**). Per altra banda, les isoformes mutades no provoquen canvis respecte la sobreexpressió de la forma endògena (**figura R.2.6.K i L**).

El rescat de Ncam2.1 (Ncam2.1 Mt) disminueix el nombre de dendrites primàries i augmenta la longitud de la dendrita principal en les neurones silenciades. Aquests canvis no s'observen amb el rescat de Ncam2.2 (Ncam2.2 Mt) (**figura R.2.6.M-P**). Tot i que el rescat de la isoforma Ncam2.2 tendeix a reduir el nombre de dendrites primàries, el descens més significatiu es produeix amb el rescat de Ncam2.1. Aquest rescat tendeix a un augment de la longitud total de l'arbre dendrític que no és significatiu. Per tant, Ncam2.1 és essencial per la formació i desenvolupament de l'arbre dendrític.





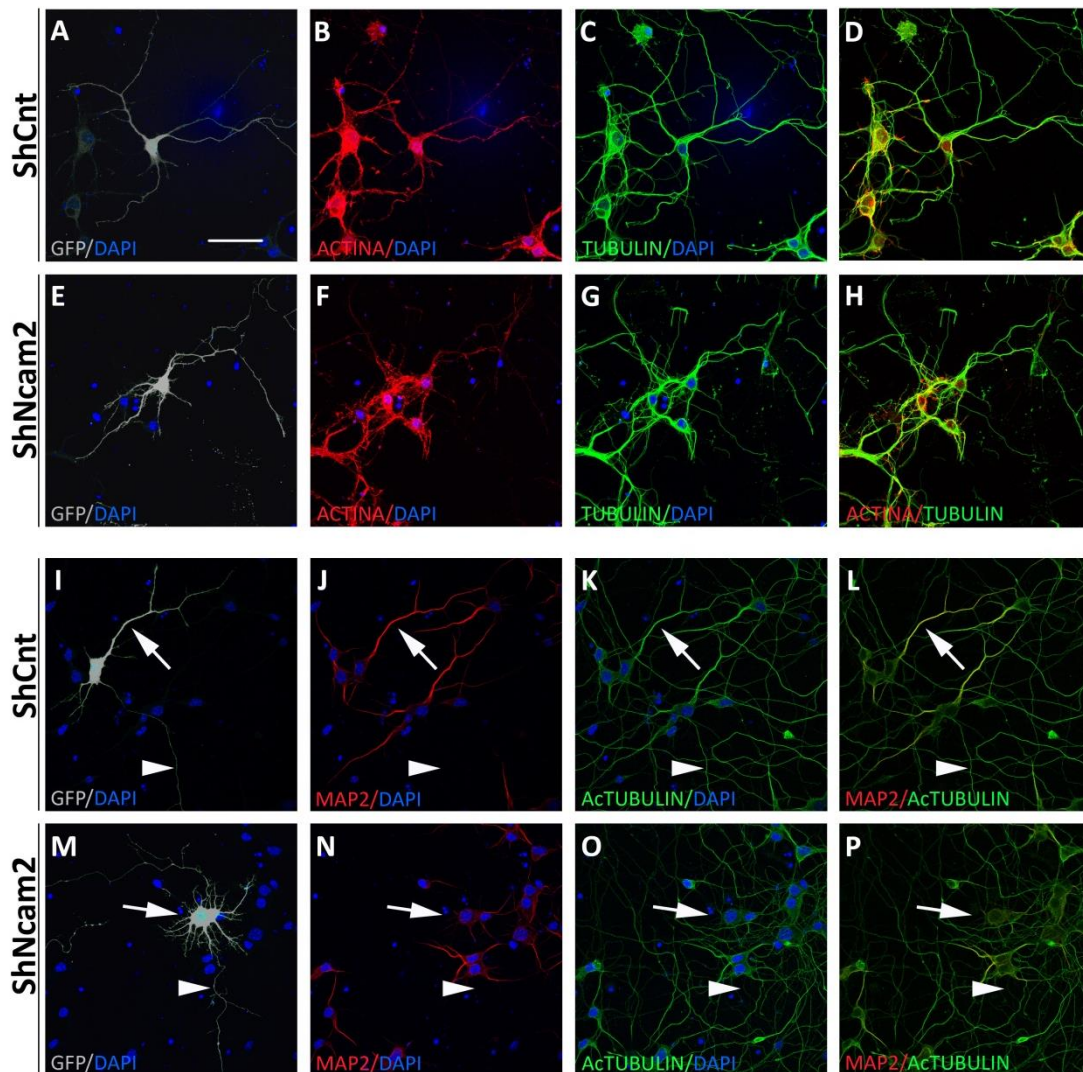
**Figura R.2.6. El rescat proteic de Ncam2.1 reverteix l'efecte sobre l'arbre dendrític del silenciament total de Ncam2.**

A) Esquema representatiu de l'obtenció dels plasmidis sobreexpressats amb mutagènesi dirigida. B) Validació per western-blott de l'eficàcia del plasmidis mutats. Cnt, és el plasmidi pCDNA3.1 sense insert. C-F) Imatges representatives de neurones cotransfectades amb els diferents plasmidis. La barra d'escala representa 50 $\mu$ m. G-L) Anàlisi Sholl de les diferents condicions. M, N, O i P) Paràmetres analitzats, (d'esquerra a dreta i de dalt a baix): longitud total de l'arbre dendrític (representat en  $\mu$ m), número de dendrites, longitud de la dendrita principal (representat en  $\mu$ m) i ramificacions (representat com apunts de ramificació per 100 $\mu$ m). Les dades estan presentades com la mitjana  $\pm$  SEM; ANOVA Turkey's post hoc test; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001. Totes les condicions estan cotransfectades amb dos plasmidis, en el cas de ShNcam2 i ShCnt empty s'ha transfectat amb pCDNA3.1.

## 2.4 El dèficit de Ncam2 altera els marcadors d'estabilitat del citoesquelet

La pèrdua de Ncam2 altera la formació de l'arbre dendrític i axonal, causant modificacions severes en el desenvolupament de la neurona. Aquesta pèrdua produeix que les dendrites siguin més primes i presentin una longitud reduïda. A més a més, l'axó presenta un increment del nombre de ramificacions. A causa d'aquests canvis, ens vam focalitzar en l'anàlisi de com podia afectar Ncam2 a les dinàmiques del citoesquelet, molt importants en el desenvolupament neuronal.

Primer, es van realitzar diferents immunodeteccions de components del citoesquelet (**figura R.2.7 i R.2.8**). Les neurones transfectades amb el plasmidi ShNcam2 no presenten canvis en la distribució de tubulina ni d'actina (**figura R.2.7 A-H**). La disminució de Ncam2 afecta els nivells de Map2 i de tubulina acetilada (**figura R.2.7 I-P**). En aquestes imatges s'observa una disminució de Map2 i tubulina acetilada. La tubulina acetilada és una modificació postraduccional que es produeix quan els microtúbuls són estables. L'enzim no modifica la tubulina no polimeritzada. Per altra banda, Map2 és una proteïna que es troba enriquida en el



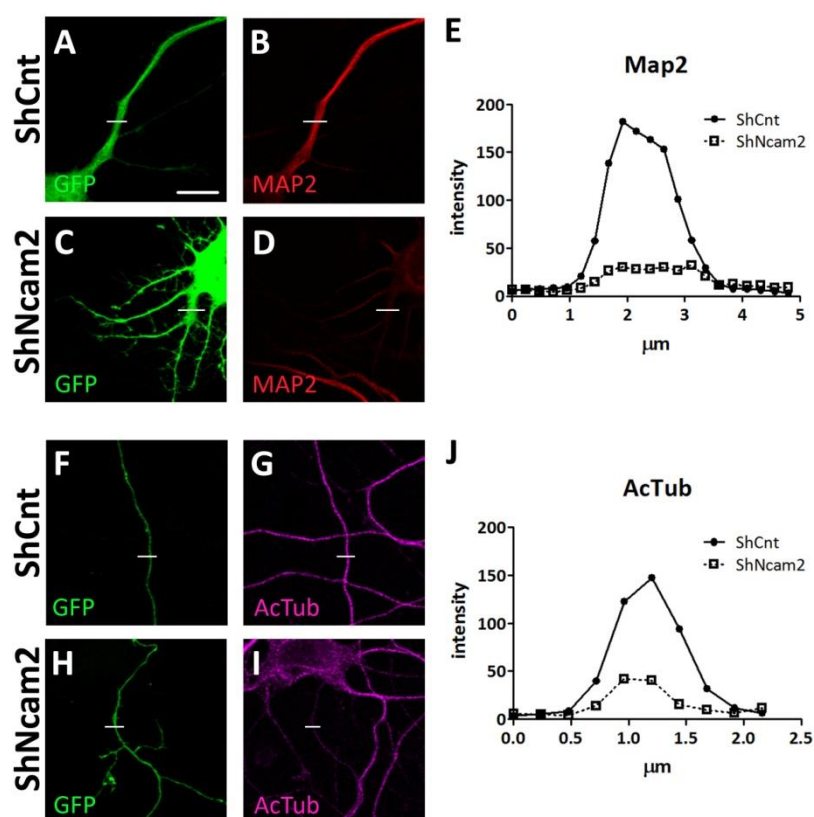
**Figura R.2.7. El dèficit de Ncam2 no modifica els nivells d'actina i tubulina, només la seva estabilitat.**

Les neurones que tenen una pèrdua de Ncam2, ShNcam2, presenten els mateixos nivells d'actina i tubulina que les neurones transfectades amb el plasmidi control, ShCnt, imatges A-H.

La pèrdua de Ncam2, ShNcam2, produeix una disminució dels nivells de Map2 a les dendrites respecte al control, ShCnt imatge N i J. La neurona ShNcam2 també té una disminució de la senyal de tubulina acetilada en l'axó respecte el control, imatge O i K. Per visualitzar les neurones transfectades es realitza una immunodetecció de GFP. Les fletxes i els caps de fletxes marquen les dendrites i l'axó, respectivament, en les imatges I-P. Barra d'escala 50µm.

compartiment dendrític, estableix els microtúbuls i interacciona amb el citoesquelet d'actina. A continuació, vam realitzar magnificacions de les imatges i es van quantificar per intensitat (**figura R.2.8**). En aquestes imatges augmentades, s'observa millor que el dèficit de Ncam2 produeix una disminució de la intensitat de senyal de Map2 en dendrites, i una disminució de tubulina acetilada en axons. Als perfils d'intensitats en els segments marcats en les imatges (**figura R.2.8 A-D i F-I**), s'aprecia la disminució de Map2 i tubulina acetilada.

Aquests resultats suggereixen que Ncam2 és una proteïna clau per l'estabilització del citoesquelet. La seva pèrdua produeix una desestabilització del citoesquelet que es veu reflectida en unes dendrites aberrants i un increment de les ramificacions de l'axó.



**Figura R.2.8. El dèficit de Ncam2 canvia els nivells de MAP2 i tubulina acetilada.**

Les neurones que tenen una pèrdua de Ncam2, ShNcam2, presenten una reducció dels nivells de Map2 en dendrites respecte el control, imatges A-D. Aquesta disminució s'observa en el perfil d'intensitat de senyal en les dendrites, diagrama E.

Les neurones que tenen una pèrdua de Ncam2, ShNcam2, tenen una reducció dels nivells de tubulina acetilada en l'axó respecte el control, imatges F-I. Aquesta disminució s'observa en el perfil d'intensitat en l'axó, diagrama J. Per visualitzar les neurones transfectades es realitza una immunodetecció de GFP.

Les línies blanques mostren els llocs on s'han mesurat les intensitats de fluorescència. Barra d'escala 10μm.

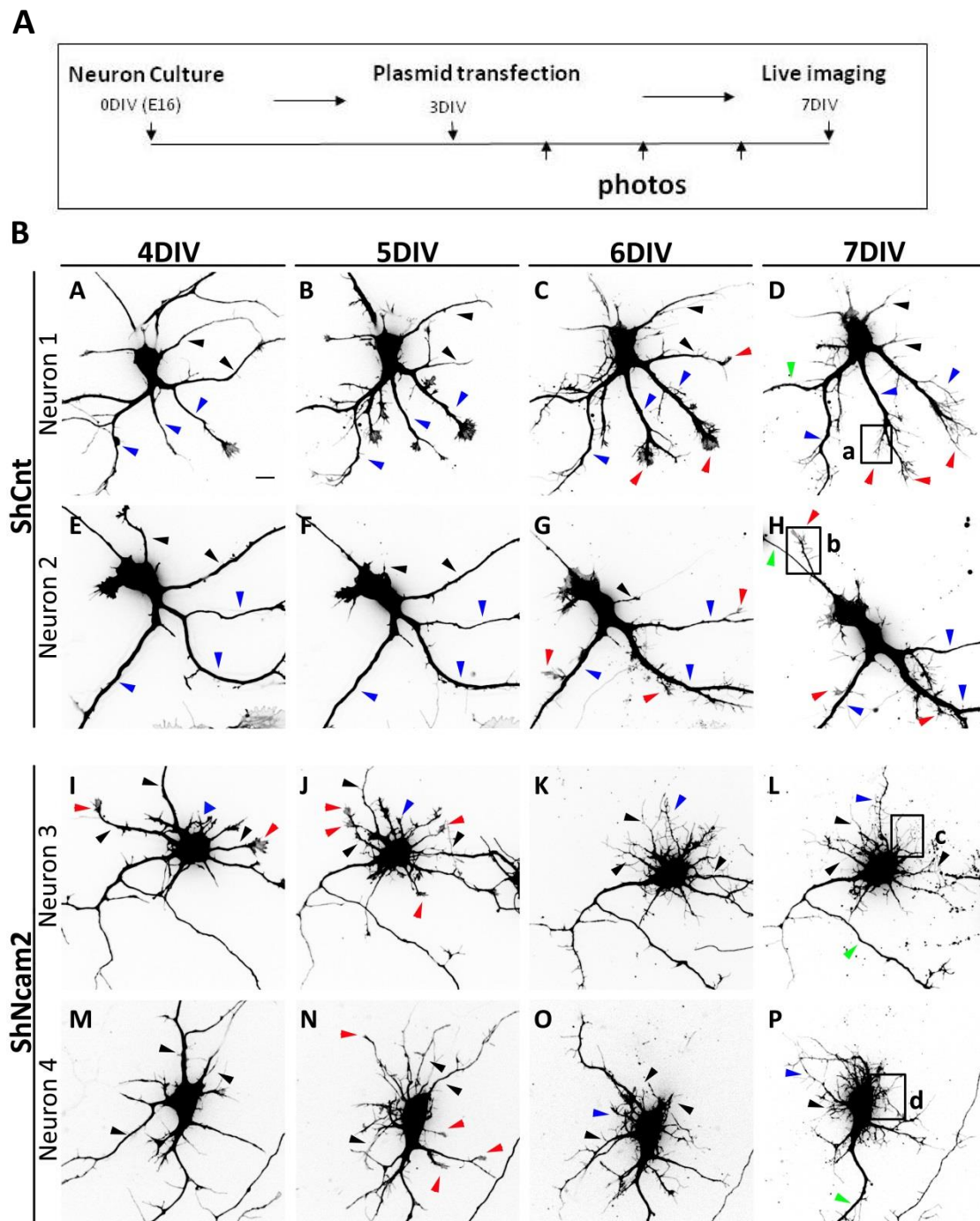


## 2.5 El silenciament de Ncam2 produeix una retracció de les dendrites existents i un con de creixement desestructurat

Les neurones amb dèficit de Ncam2 presenten una morfologia anormal. Ens vam centrar amb les dendrites per saber com es generava el fenotip observat. Ens vam plantejar dos questions: si les dendrites existents a l'inici de l'estadi 4 de Banker no es desenvolupen i donen lloc a les dendrites aberrants, i com apareixen les dendrites *de novo*.

Per respondre la pregunta, vam seguir el següent abordatge (**figura R.2.9.A**): vam fotografiar les neurones cada 24h a partir de la transfecció. A l'últim dia vam adquirir una imatge cada 30 segons durant 30 minuts per poder observar la mobilitat de les dendrites i els seus cons de creixement (**figura R.2.9 i 2.10**).

En les neurones controls (**neurones 1 i 2 de la figura R.2.9**), s'observa com les dendrites existents a l'inici de l'estadi s'estabilitzen i es consoliden (caps de fletxes de color blaves). A més a més, es produeix alguna pèrdua de dendrites (caps de fletxes negres). En el cas de les neurones controls, el percentatge de dendrites consolidades és major que el nombre de pèrdues. En les neurones que presenten un dèficit de Ncam2, en canvi, es produeix majoritàriament una retracció de les dendrites existents en un període de 2-3 dies (caps de fletxes de color negres en les neurones 3 i 4). A més a més, en aquestes neurones es produeix una menor estabilització de les noves dendrites (caps de fletxes de color blaves). En general, les dendrites de les neurones sense Ncam2 són totes més primes. En el cas de la neurona 3, es pot observar com la fletxa blava assenyala una nova prolongació molt fina. Per tant, la pèrdua de Ncam2 produeix una retracció de les dendrites existents a l'inici de l'estadi i l'aparició de noves (**figura R.2.9**).

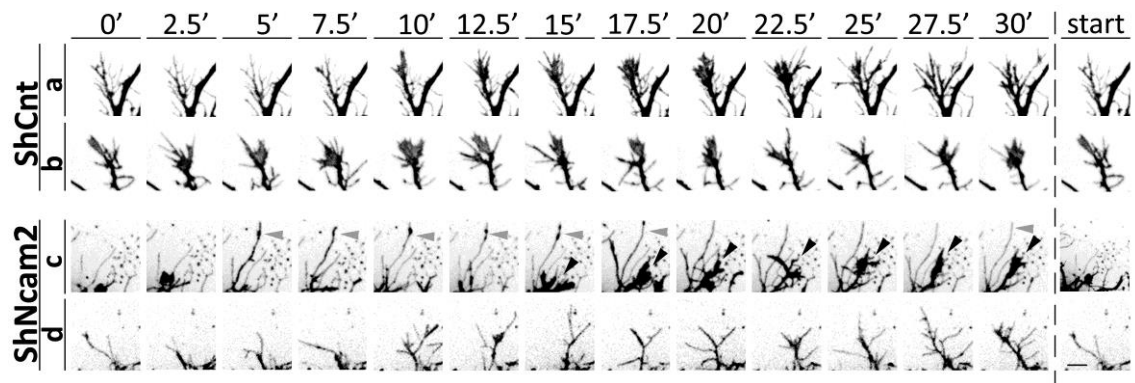


**Figura R.2.9. La pèrdua de Ncam2 produeix una retracció de les dendrites existents a l'inici de l'estadi 4 de Banker i també genera l'aparició de noves prolongacions des del soma.**

A) Esquema de l'abordatge experimental. Les neurones es fotografien cada 24h a partir de la transfecció. A l'últim dia s'adquireix una imatge cada 30 segons durant 30 minuts per poder observar la mobilitat de les dendrites i els seus cons de creixement.

B) Seguiment de les neurones transfectades al llarg dels dies. En les neurones es pot observar el manteniment, caps de fletxes blaves, o desaparició, caps de fletxes negres, de les dendrites presents a l'inici de l'estadi 4 de Banker. En el cas de les neurones que tenen el ShRNA d'interferència de Ncam2, ShNcam2, s'observa com la majoria de dendrites existents al 4DIV es retrauen i apareixen moltes dendrites de nou, primes i de poca longitud. També s'ha marcat l'axó amb un cap de fletxa de color verd.

Els cons de creixement en les dendrites es marquen en algun exemple amb caps de fletxa de color vermell. En les neurones controls, ShCnt, s'observen cons en el dia 6 i dia 7. En canvi, en les neurones en les quals hi ha un dèficit de Ncam2, ShNcam2, la presència de cons de creixement amb una estructura definida desapareixen a 5DIV. Barra d'escala 10µm.



**Figura R.2.10. La morfologia i mobilitat dels cons de creixement es veu alterada amb la pèrdua de Ncam2.**

En el 7DIV, es van realitzar captures consecutives cada 30 segons durant 30minuts. En aquesta figura s'ha representat la imatge obtinguda cada 150segons. D'esquerra a dreta hi ha l'evolució temporal i l'última columna de la dreta, start, hi ha la imatge inicial. Les imatges adquirides permeten observar la mobilitat del con de creixement tant en les neurones controls, a i b, com en les neurones transfectades amb el ShNcam2, c i d. Els cons de creixement en condicions normals tenen una estructura característica, amb un citoesquelet d'actina que forma els lamel·lipodis i els fil·lopodis, a i b. Aquestes estructures es poden observar en el seguiment temporal de les neurones controls però es difícil d'observar-les en les neurones amb dèficit de Ncam2. El creixement de les dendrites es produeix sense con de creixement, cap de fletxa de color gris. En el cas de la neurona c, s'observa un eixamplament de la membrana però no presenta una estructura definida, marcat amb un cap de fletxa de color negre. Barra d'escala 5μm.

A més a més, l'últim dia ens vam fixar en la mobilitat del con de creixement de les dendrites, marcats amb caps de fletxes de color vermell. En les neurones controls, els cons de creixement s'observen al llarg de tots els dies. En les neurones amb un dèficit de Ncam2, en canvi, els cons de creixement s'observen fins a 5DIV. A partir d'aquest dia, en aquestes neurones només s'observen prolongacions amb estructures poc definides.

Els cons de creixement presenten en condicions normals un moviment anterògrad per elongar l'estructura (**figura R.2.10.a**), o fluctuant d'exploració de l'entorn (**figura R.2.10.b**). A més a més, aquests cons de creixement presenten fil·lopodis i lamel·lipodis a la zona exterior del con. En el cas de les neurones deficientes de Ncam2, les dendrites no presenten cons de creixement amb morfologia i mobilitat normal (**figura R.2.10 c i d**). Aquestes dendrites tenen processos d'elongació (**figura R.2.10.d. i el cap de fletxa gris en la figura R.2.10.c**), però no s'observen cons de creixement amb les estructures normals de lamel·lipodis i fil·lopodis. En algun cas s'observen estructures una mica més extenses, però no arriben a la forma de les neurones controls (**fletxa negra de la figura R.2.10.c**).

Per tant, la pèrdua de Ncam2 produeix una desestructuració de les dendrites que afecta els l'estructura i la mobilitat dels cons de creixement.

## 2.6 La pèrdua progressiva de Ncam2 produeix un canvi en el citoesquelet

Per confirmar que la pèrdua de Ncam2 donava lloc al fenotip de les neurites i que estava vinculat a la modificació del citoesquelet, es van realitzar unes immunodeteccions de Map2 i actina de les neurones enregistrades al llarg del temps (**figura R.2.11**).

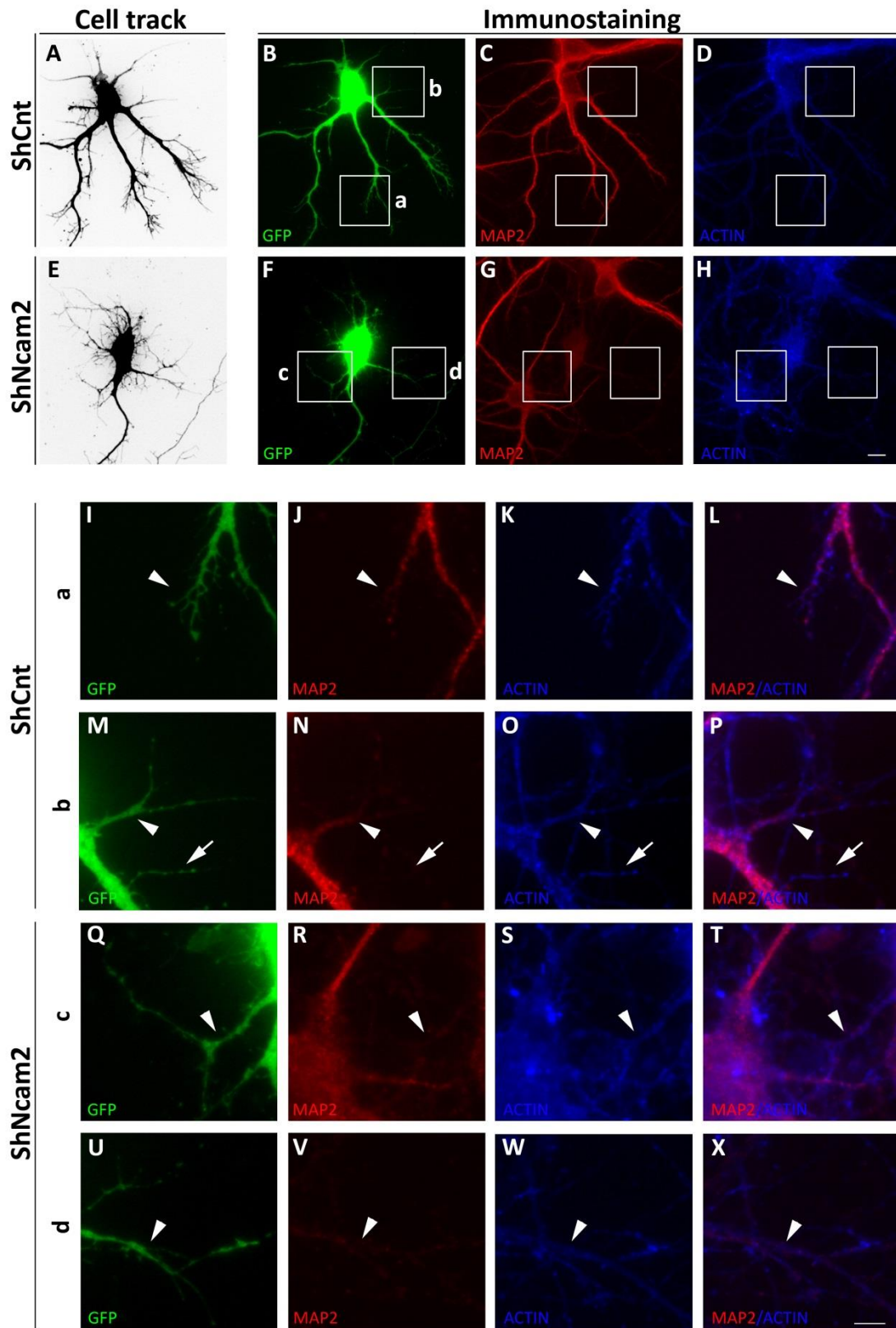
A través de la localització específica i l'expressió de GFP de les neurones transfectades (**figura R.2.9**) vam poder identificar les neurones i realitzar un estudi de l'estabilitat del citoesquelet (**figura R.2.11 A-H**). Les neurones control, ShCnt, presenten ramificacions de les dendrites principals (**figura R.2.11.A-D**). Aquestes ramificacions poden ser Map2 positives o negatives (**figura R.2.11.I-P**). Les negatives per Map2 presenten un marcatge d'actina, la qual cosa ens indica que les ramificacions no són estables i presenten una morfologia de fil·lopodi, més làbil i dinàmica. La pèrdua de Ncam2 produeix que totes les prolongacions que surten del soma tinguin unes estructures de fil·lopodis, riques amb actina i negatives per Map2 (**figura R.2.11. Q-X**).

Hem fet un seguiment del con de creixement d'una dendrita control (**figura R.2.10**), analitzant l'estructura d'aquest con (**figura R.2.11.I-L**). Aquest presenta un marcatge extern d'actina i una part central amb Map2. Com hem vist a l'apartat de la introducció "Polarització neuronal", els cons de creixement presenten unes estructures riques en actina a la part externa, i a l'interior trobem filaments de microtúbuls. Els microtúbuls són claus per l'estabilització i elongació de les dendrites. En aquest sentit, una de les proteïnes involucrades en la interacció entre el citoesquelet d'actina i microtúbuls en el con de creixement és Map2.

Prèviament, hem observat que les dendrites de les neurones amb dèficit de Ncam2 no presenten un con de creixement en les terminacions (**figura R.2.10**). A més a més, l'organització del citoesquelet no és l'estàndard (**figura R.2.11. U-X**): detectem una senyal d'actina normal però la senyal de Map2 és molt fluixa. Per tant, el citoesquelet de microtúbuls no és estable.

Tal i com havíem descrit anteriorment, observem una disminució de la intensitat de Map2 en les neurones amb un dèficit de Ncam2 (**figura R.2.11**). Els controls presenten una senyal més intensa de Map2 en les dendrites respecte a les neurones que tenen un dèficit de Ncam2. Així doncs, es confirmen les dades prèvies (**figura R.2.7 i R.2.8**).

Aquests resultats ens indiquen que la pèrdua de Ncam2 desestabilitza el citoesquelet, afectant a les dendrites existents i produint la seva retracció. El citoesquelet d'actina no està tan alterat com el de microtúbuls. Per altra banda, les estructures complexes que necessiten una interacció i organització entre les diferents proteïnes del citoesquelet es troben alterats, com per exemple, els cons de creixement.



**Figura R.2.11. Immunodetecció de Map2 i actina en les neurones enregistrades al llarg del temps.**

En el 7DIV, es van fixar les neurones de la figura R.2.9 i R.2.10. Es va realitzar una immunocitologia de Map2 i actina. Les dendrites estabilitzades al llarg del temps en les neurones controls, ShCnt, presenten un marcatge de Map2, imatges de A-D. Les neurones amb un dèficit de Ncam2, ShNcam2, que presenten una retracció de les dendrites tenen menys senyal de Map2, E-H, respecte el control.

En les magnificacions marcades (a, b, c i d) podem observar millor l'estructura del citoesquelet de les neurones (I-X). Les dendrites principals de les neurones control presenten ramificacions algunes d'elles positives per Map2 i altres negatives, caps de fletxes i fletxes, respectivament (M-P). Els cons de creixement en el qual ens hem fixat en la figura R.2.10 presenten marcatge de Map2 (I-L). Les dendrites primes i curtes que surten del soma de les neurones deficientes de Ncam2, marcades amb caps de fletxes, són positives per actina i negatives per Map2 (Q-X). Barra d'escala 10µm en les imatges A-H i 5µm en les imatges de I-X.

## 2.7 El Taxol reverteix l'aparició de l'arbre dendrític aberrant

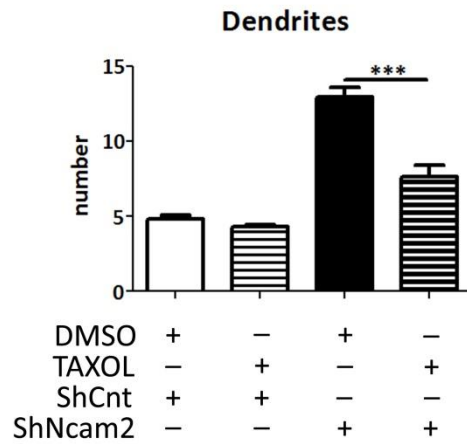
El Taxol és una substància que estabilitza els microtúbuls i evita el fenomen de catàstrofe. El seu efecte és diferent segons l'estadi de diferenciació neuronal en que es realitza el tractament (Witte et al., 2008). En l'estadi 2 o 3 de Banker, el Taxol produeix l'aparició de dos axons. En l'estadi 4 de Banker, en canvi, estabilitza els microtúbuls però no produeix l'aparició de 2 axons. Hem observat que el dèficit de Ncam2 provoca l'aparició de les dendrites aberrants com a possible conseqüència de la desestabilització del citoesquelet. En aquest sentit, es va analitzar si el tractament amb Taxol podria revertir el fenotip del dèficit de Ncam2. Es va seguir el mateix abordatge experimental que ens els apartats anteriors: es van transfectar els ShRNAs, a 3DIV, i es va fer el tractament amb el Taxol o el vehicle (DMSO) a partir de 4DIV. Les neurones es van fixar a 7DIV i es va mirar el nombre de prolongacions que sortien del soma (**figura R.2.12**).

El Taxol inhibeix l'aparició de les dendrites aberrants originades per la pèrdua de Ncam2. En les neurones amb un dèficit de Ncam2, ShNcam2, tractades amb Taxol, es produeix una reducció molt significativa del nombre de dendrites respecte a les neurones que només estan tractades amb el vehicle (**figura R.2.12.A**).

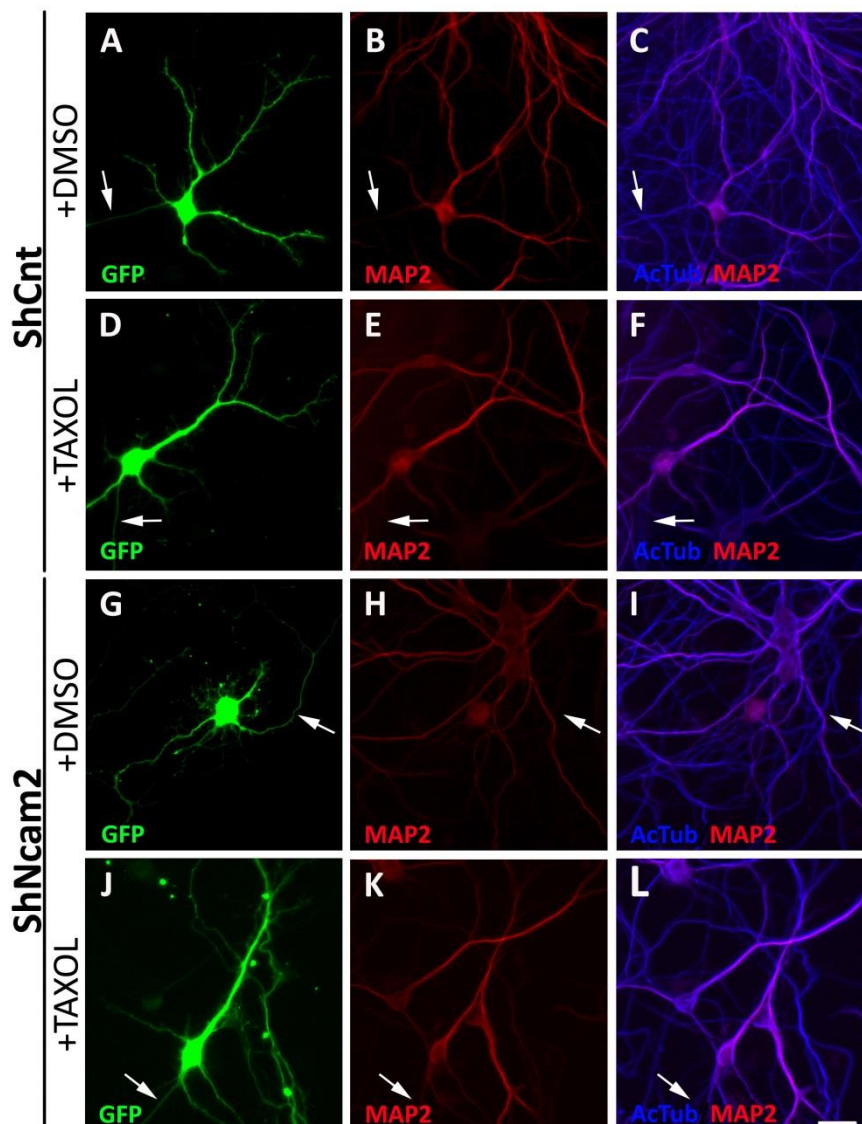
En les imatges d'immunofluorescència s'observa que la neurona amb dèficit de Ncam2, ShNcam2, presenta una pèrdua de senyal de Map2 com s'havia descrit en els apartats anteriors (**figura R.2.8 i figura R.2.11**). El tractament amb Taxol evita la desestabilització dels microtúbuls, evitant la pèrdua de senyal de Map2 en neurones ShNcam2 (**figura R.2.12.B J-L**). L'addició de Taxol no produeix canvis significatius en les neurones controls (**R.2.12.B A-F**).

Per tant, una pèrdua de Ncam2 produeix, en quant a la dendritogènesi, una desestabilització del citoesquelet de microtúbuls, que es reflecteix en una menor intensitat de Map2 i tubulina acetilada en les dendrites o axons de les neurones transfectades. Aquesta es reverteix amb l'estabilització induïda dels microtúbuls.

**A**



**B**



**Figura R.2.12. El tractament amb Taxol reverteix l'aparició de les dendrites aberrants amb la pèrdua de Ncam2.**

Les neurones transfectades amb els diferents ShRNAs, van ser tractades des de 4DIV fins a 7DIV amb 3µM de Taxol o DMSO. Les neurones es van fixar a 7DIV, i es van comptar el nombre de prolongacions que sortien del soma, A.

Es va realitzar una immunocitologia de neurones fixades a 7DIV, B, per detectar tubulina acetilada, AcTub, i Map2. Per visualitzar les neurones transfectades es va realitzar una immunodetecció de GFP. L'administració de Taxol produeix que les cèl·lules amb un dèficit de Ncam2 (G-L) recuperin els nivells de Map2 semblants als controls (A-F). Les fletxes blanques marquen els axons de les neurones transfectades.

Les dades estan presentades com la mitjana ± SEM; ANOVA Turkey's post hoc test; \*\*\*p<0.001.

La barra d'escala 10µm.

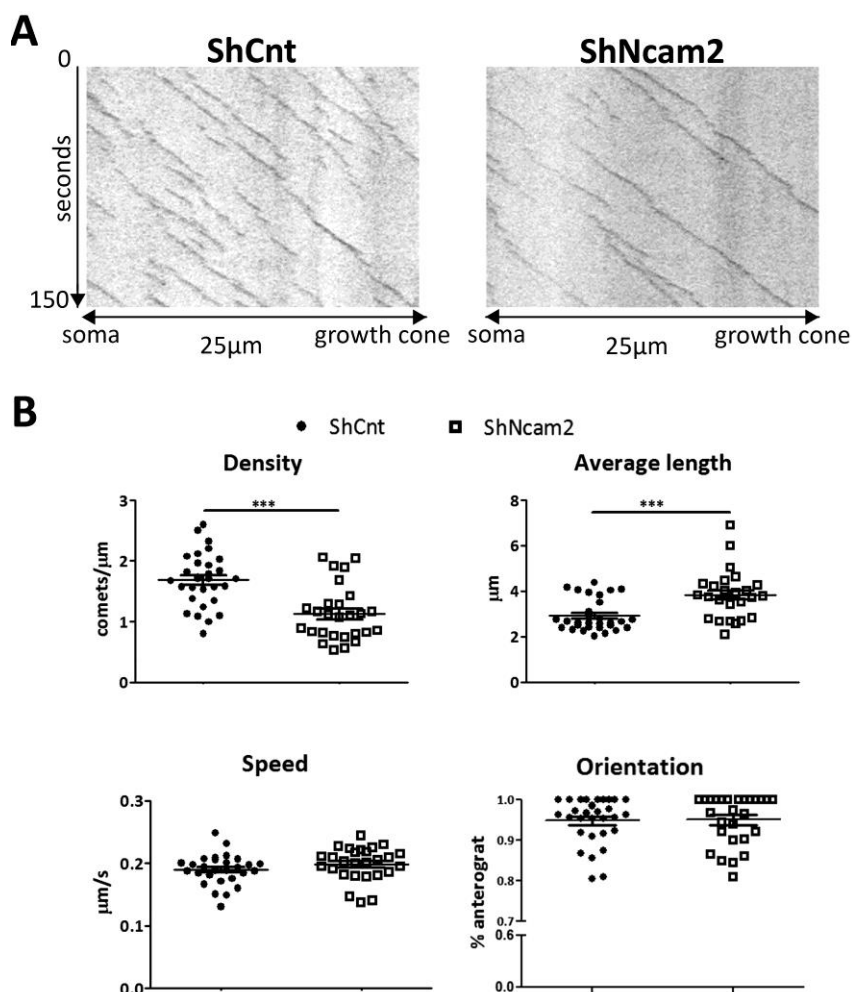
## 2.8 La pèrdua de Ncam2 afecta la polimerització de microtúbuls

A nivell axonal hem observat que la pèrdua de Ncam2 produeix una disminució de la tubulina acetilada, indicatiu d'una menor estabilitat dels microtúbuls (**figura R.2.8**). Aquesta falta d'estabilització dona lloc a un augment de les ramificacions axonals. La pèrdua de Ncam2, en algun cas, afecta la polarització de tal forma que es formen dos estructures proto-axonals (**figura R.2.5**).

La regulació de les dinàmiques de polimerització de microtúbuls és essencial pel manteniment de les funcions de transport i tràfic axonal necessaris per mantenir la polaritat neuronal. En aquest sentit, es van realitzar experiments per analitzar la funció de Ncam2 sobre la polimerització de microtúbuls. Es va utilitzar la proteïna recombinant EB3-Tomato per marcar l'extrem positiu dels microtúbuls en formació (Sanchez-Huertas et al., 2016). Aquesta proteïna recombinant s'utilitza per estudiar la polimerització, ja que quan es polimeritzen els microtúbuls s'observa una senyal brillant al llarg de l'axó, anomenada cometa.

Els cultius neuronals es van transfectar a 4DIV amb el plasmidi i es van realitzar les filmacions a 6DIV. Aquest abordatge experimental és diferent per evitar que una sobreexpressió de EB3-Tomato interfereixi en el possible fenotip causat per la falta de Ncam2.

Per realitzar l'anàlisi de la polimerització de microtúbuls ens vam centrar en la part axonal de les neurones que presentaven únicament un axó. La pèrdua de Ncam2, ShNcam2, modifica les dinàmiques de polimerització dels microtúbuls (**figura R.2.13**). En aquestes neurones es produeixen menys cometes: té lloc una reducció del 36% i la seva longitud és un 30% superior

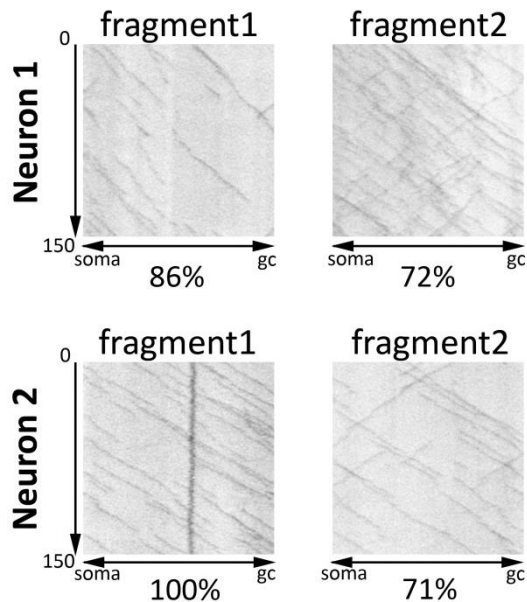


**Figura R.2.13. La pèrdua de Ncam2 genera canvis en les dinàmiques de polimerització de microtúbuls.**

Es va registrar els cometes de les neurones co-transfectades amb els ShRNAs i el plasmidi EB3-Tomato, les imatges obtingudes es van processar per obtenir els kymògraf, A. Es van quantificar diferents paràmetres relatius als cometes (d'esquerra a dreta i de dalt a baix): densitat de cometes (representat en número per µm), longitud mitjana dels cometes (representat en µm), velocitat mitjana (representat en µm/s) i l'orientació dels cometes (representat en tant per 1). Les dades estan presentades com la mitjana ± SEM; t-test; \*\*\*p<0.001.



per fragment d'axó analitzat. En aquestes neurones, en canvi, no hem observat canvis en l'orientació o velocitat dels cometes. La majoria de cometes presenten una orientació anterògrada (**figura R.2.13.A**). Per tant, Ncam2 afectaria l'estabilitat dels microtúbuls disminuint els fenòmens de polimerització. La longitud es veu augmentada perquè es produeix una major disponibilitat de tubulina no polimeritzada en microtúbuls, fet que facilita la seva incorporació a les fibres en formació.



Durant la gravació dels diferents fragments, es va observar que algunes neurones transfectades amb el plasmidi ShNcam2 presentaven dues prolongacions semblants a un doble axó, fenomen descrit prèviament (**figura R.2.5.C**). També es va analitzar la dinàmica dels cometes en aquestes prolongacions (**figura R.2.14**). En aquestes prolongacions de la mateixa neurona, els cometes presenten orientacions diferents. En concret, en un dels segments l'orientació anterògrada dels cometes és inferior al 80%, quan normalment és superior al 90%. A nivell estructural, el proto-axó amb menor orientació anterògrada presenta una organització de microtúbuls semblant a les dendrites.

**Figura R.2.14. Cometes en neurones que presenten dos proto-axons.**

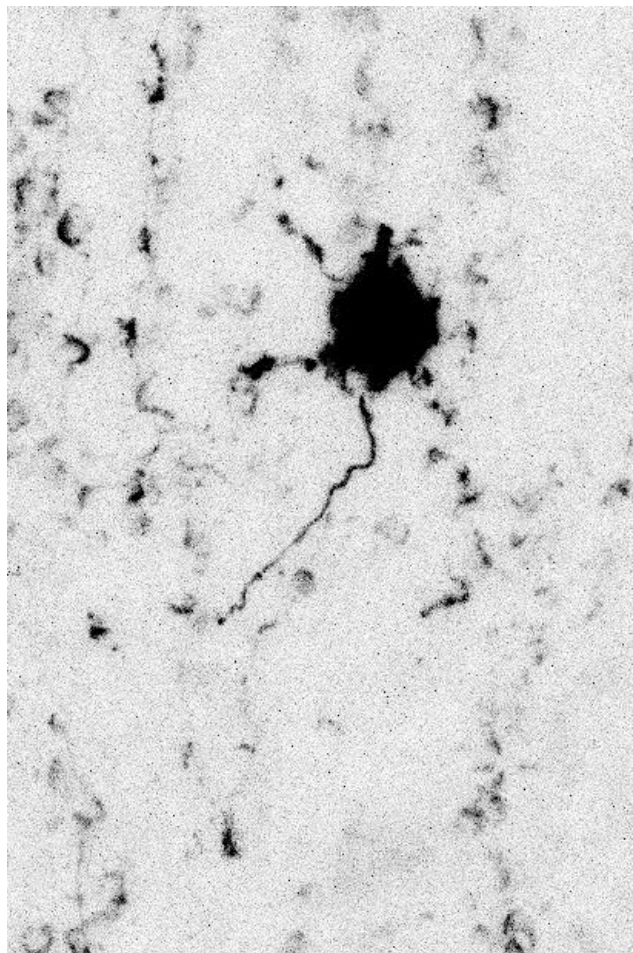
Es van enregistrar els cometes de dues neurones co-transfectades amb el ShNcam2 que presentaven dos possibles axons, fragment 1 i 2. El temps analitzat és de 150 segons. Tots els fragments tenen una longitud de 18µm. Hi ha representat el número del percentatge de l'orientació anterògrada, del soma al con de creixement (gc).

Ncam2 és essencial per a la correcta polarització neuronal i formació de l'arbre dendrític i axonal a través del citoesquelet. La falta de Ncam2 produeix canvis en la formació de les dendrites i la ramificació axonal degut a un procés de retracció de les dendrites existents i l'augment de la inestabilitat del citoesquelet de microtúbuls. Aquest mecanisme s'observa amb una disminució de l'acetilació de la tubulina i una reducció de la senyal de Map2. Per altra banda, aquests fenotips es reverteixen amb l'addició de drogues estabilitzadores dels microtúbuls, com per exemple, el Taxol. A més a més, la pèrdua de Ncam2 i la inestabilitat ocasionada generen dinàmiques de polimerització de microtúbuls anormals. Es produeixen un menor nombre de cometes, fenomen que reflecteix un desequilibri en les dinàmiques de microtúbuls.

D'aquesta manera, els diferents experiments demostren que Ncam2 és una molècula clau que regula dinàmiques del citoesquelet necessàries per a la morfogènesi de neurones hipocampals *in vitro*. Aquestes dinàmiques podrien anar associades a la cua citoplasmàtica de la isoforma Ncam2.1. Aquesta isoforma és molt abundant en els estadis inicials de desenvolupament de l'arbre dendrític i axonal i la seva funció s'ha demostrat amb el rescat parcial del fenotip de silenciament.

## Capítol 3

### Funció de Ncam2 en el desenvolupament del còrtex *in vivo*



### 3.1 Ncam2 participa en la formació del còrtex

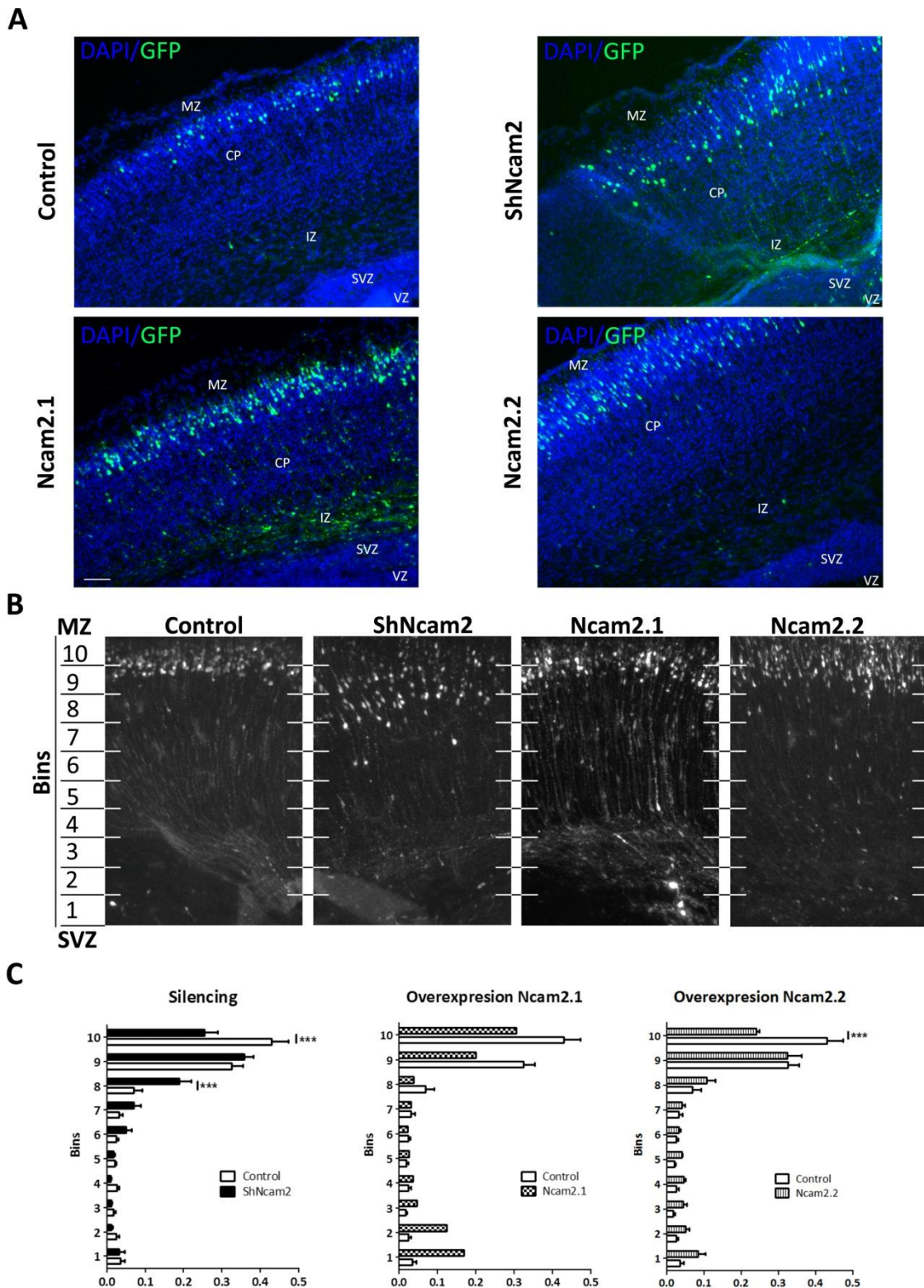
Les neurones piramidals que formen el còrtex es posicionen seguint un model de dins-fora. Les neurones generades migren de forma radial, creuen la capa de les neurones generades prèviament i es col·loquen en posicions més distals. D'aquesta manera les neurones generades els últims dies en l'estadi embrionari ocupen capes més superficials. En el primer capítol de resultats, hem observat que Ncam2 es troba expressada en el telencèfal, tant en còrtex com en hipocamp. En concret, en el còrtex en formació detectem Ncam2 en totes les zones: la zona de neurogènesi (zones ventriculars i subventricular), la zona intermèdia i la zona de la capa cortical. Hem pogut determinar que Ncam2 és una molècula clau per la polarització i formació de l'arbre dendrític i axonal *in vitro*. *In vivo*, aquest procés de polarització té lloc entre les zones subventricular i intermèdia quan la neurona generada té una transició de fenotip MP (multipolar) a BP (bipolar). En aquesta transició es defineixen el procés líder (LP) i el procés de retracció de les parts distals (TP), que donaran lloc a les dendrites apicals i l'axó, respectivament.

A partir del patró d'expressió i els resultats *in vitro*, hem estudiat la funció de Ncam2 en la formació del còrtex *in vivo*. Tal i com s'ha comentat en la introducció, trobem diferents molècules involucrades en fenòmens de polarització i desenvolupament de l'arbre dendrític *in vitro* que en analitzar la funció en models *in vivo* no es corrobora les dades observades (Barnes and Polleux, 2009). En el nostre cas, existeix l'animal deficient de Ncam2. En la bibliografia no es detalla els efectes de la pèrdua de Ncam2 en la formació del còrtex (Walz et al., 2006). Per aquests motius, com abordatge experimental realitzem electroporacions *in utero* per crear un canvi agut en els nivells de Ncam2 en un moment concret (Tabata and Nakajima, 2001). D'aquesta manera s'eviten fenòmens de compensació que tenen lloc en molts models animals de proteïnes involucrades en la polarització *in vitro* (Barnes and Polleux, 2009).

L'electroporació *in utero* ens permet modular l'expressió de Ncam2 en les neurones que es generen en un determinat moment i analitzar com aquests canvis afecten a la migració neuronal i posicionament. En concret, es van electroporar cervells de ratolins embrionaris de 14,5 dies de gestació, moment en el que els progenitors de les neurones piramidals localitzats en els ventricles generen les neurones que donen lloc a les capes II-III. Els animals electroporats es van sacrificar 5 dies postoperació.

Al moment en el que es fixen els cervells electroporats, les neurones transfectades amb el plasmidi control es posicionen en les capes II-III. Les neurones que tenen un dèficit de Ncam2, ShNcam2, o una sobreexpressió de Ncam2, Ncam2.1 o Ncam2.2, no es posicionen igual que els controls (**figura R.3.1**). Les imatges capturades per les diferents condicions es van dividir en 10 divisions (bins), des de la zona ventricular fins a la marginal (**figura R.3.1.B**).

Les neurones que presenten un dèficit de Ncam2 es localitzen en zones més inferiors respecte el control. Es produeix una reducció significativa del percentatge de neurones que ocupen les posicions més superficials, bin 10, i un augment de les neurones que ocupen posicions més profundes, bin 8. Aquesta localització errònia en el moment de la fixació del cervell pot ser deguda a que la pèrdua de Ncam2 afecta els processos de migració, en la transició multipolar-bipolar o els processos de LP o TP. L'altre hipòtesi és que la pèrdua de Ncam2 produeixi un posicionament erroni en el còrtex en formació perquè Ncam2 afecti la translocació somal terminal o la internalització de senyals externes que generin un efecte de parada.



**Figura R.3.1. Canvis en l'expressió de Ncam2 produeixen canvis en la migració de les neurones corticals.**

A) Imatges dels còrtex del cervell en diferents condicions experimentals, d'esquerra a dreta i de dalt a baix: Control (electroporat amb el plasmidi pWPI), ShNcam2, sobreexpressió de Ncam2.1 i sobreexpressió de Ncam2.2. En blau DAPI i en verd la GFP. El GFP marca les cèl·lules electroporades. B) Exemple de les imatges quantificades en les diferents condicions. Les imatges adquirides es van dividir en 10 fragments i es va quantificar el percentatge de neurones transfectades presents a cada fragment. C) Gràfiques de les quantificacions de les diferents condicions experimentals, cada bin amb el seu percentatge. Les dades estan presentades com la mitjana  $\pm$  SEM; t-test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Abreviacions: CP, placa cortical; IZ, zona intermèdia; MZ, zona marginal; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular. Barra d'escala: 200 $\mu$ m

Els resultats preliminars per la condició de sobreexpressió de Ncam2.1, indiquen que l'excés de Ncam2.1 produiria una retenció de les neurones en posicions més inferiors. Trobem una acumulació de les neurones en les zones subventricular i intermèdia. Aquest fet redueix el percentatge de neurones que arriben a les capes superficials (**figura R.3.1.B**).

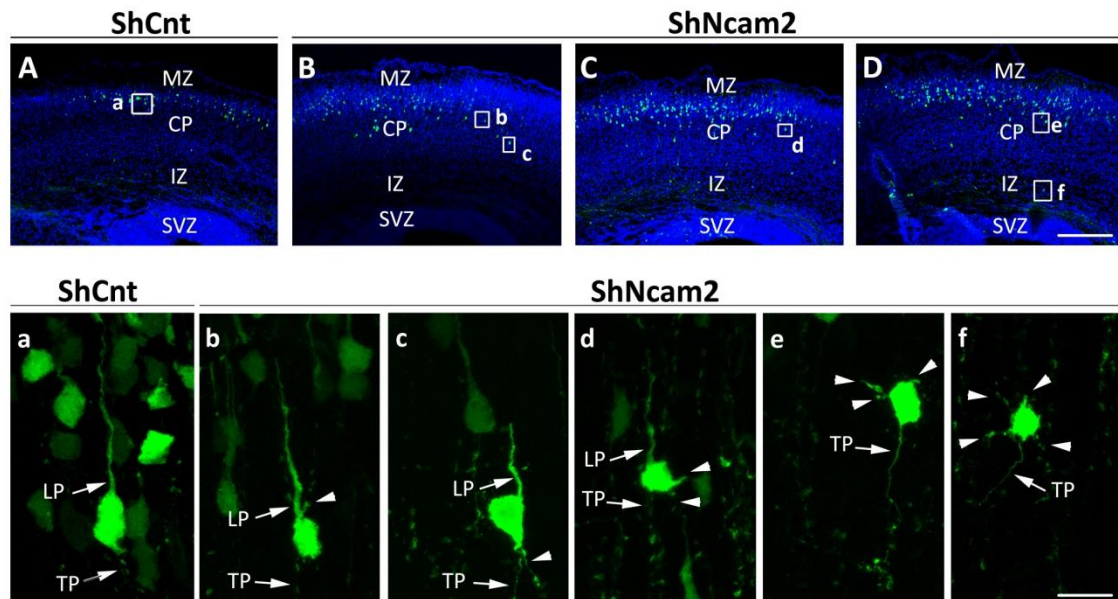
Per altra banda, les neurones amb sobreexpressió de Ncam2.2 queden retingudes en zones ventrals, dins la placa cortical. Això produeix una reducció significativa del percentatge de cèl·lules presents al bin 10. En general, trobem un augment no significatiu en totes les capes més ventrals que originen la disminució significativa en la capa més externa (**figura R.3.1.B**).

Els canvis observats produïts per la sobreexpressió de la isoforma Ncam2.1 o Ncam2.2 són diferents entre ells. En aquest sentit, la retenció induïda per Ncam2.1 és específica en les zones prèvies a la capa cortical en formació, en les zones intermèdies i subventricular. Les neurones que sobreexpressen Ncam2.2, en canvi, tenen una retenció homogènia al llarg de totes les zones. Aquests resultats posen de manifest que Ncam2 participa en els processos de migració i posicionament de les neurones en el còrtex.

### **3.2 La pèrdua de Ncam2 modifica la morfologia de les neurones posicionades ectòpicament *in vivo***

El dèficit de Ncam2 en cultius neuronals *in vitro* produeix una desestructuració del citoesquelet que origina un arbre dendrític aberrant. En aquest sentit, en diferents regions de cervell on trobem neurones amb un dèficit de Ncam2 observem una morfologia atípica de les neurones que tenen un mal posicionament (**figura R.3.2**). En condicions normals, ShCnt, les neurones quan migren presenten un LP i un TP, marcats en fletxes blanques (**figura R.3.2.a**). En el cas de les neurones amb un dèficit de Ncam2, en canvi, presenten petites ramificacions o prolongacions atípiques que surten del soma (**caps de fletxes de la figura R.3.2**). Aquestes petites prolongacions són morfològicament semblants a les prolongacions aberrants observades en els experiments *in vitro*, i podrien manifestar canvis en les dinàmiques del citoesquelet.

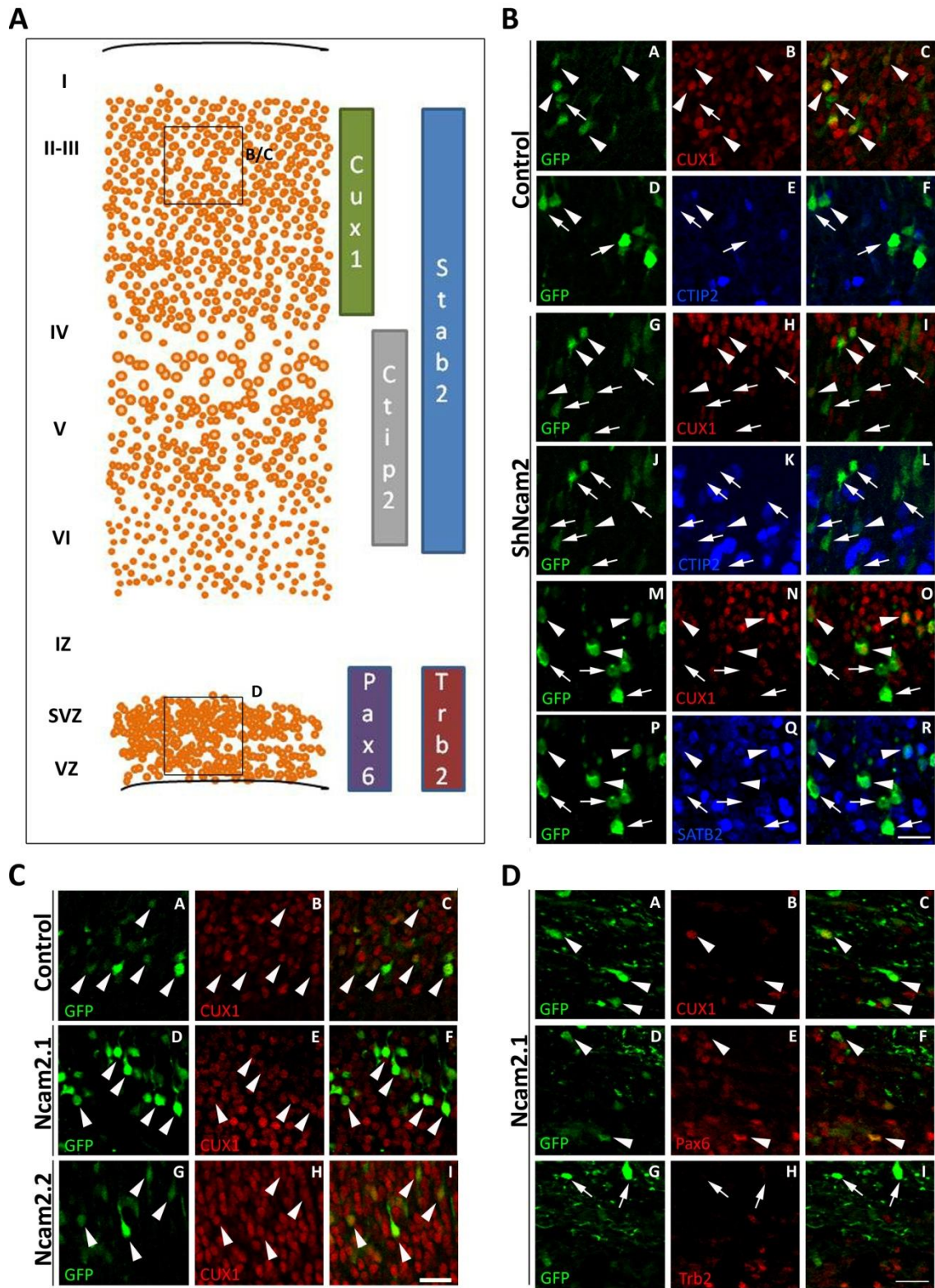
A nivell d'exemple, observem alguna neurona que presenta dos LP (**figura R.3.2.b**) o dos TP (**figura R.3.2.c**). Algunes neurones presenten múltiples prolongacions del soma (**figura R.3.2.d**). Fins i tot, observem neurones que no presenten LP i presenten prolongacions del soma (**figura R.3.2. e i f**). Les neurones que es localitzen en posicions ventrals presenten aquestes alteracions. Així doncs, el posicionament erroni i l'observació d'aquestes prolongacions podrien indicar que la pèrdua de Ncam2 produeix alteracions en el LP i el TP durant la migració, provocant el retard o la parada de la migració.



**Figura R.3.2. La pèrdua de Ncam2 produeix una morfologia atípica de les neurones posicionades ectòpicament *in vivo*.** Les neurones control quan migren presenten un LP i un TP (A i a), però les neurones amb déficit de Ncam2 localitzades en posicions més profundes al llarg del còrtex presenten una morfologia atípica (B-D i b-f). Algunes neurones presenten dos LP (b) o dos TP (c). Altres neurones presenten múltiples prolongacions del soma (d). Fins i tot observem neurones que no presenten LP i presenten prolongacions en el soma (e i f). Barra d'escala en imatges A-D 200µm i en les imatges a-e 15µm.

### 3.3 Els canvis d'expressió de Ncam2 i els marcadors neuronals

Hem observat que les neurones que tenen canvis d'expressió de Ncam2, en el moment de la fixació del cervell no es localitzen igual que el control. A més a més de la morfologia, ens vam centrar en determinar si la modificació de l'expressió de Ncam2 afectava els tipus de marcadors neuronals (**figura R.3.3**). Molts d'aquests marcadors neuronals són factors de transcripció involucrats en la diferenciació neuronal de les neurones corticals. D'aquesta manera, les neurones corticals expressen diferents factors de transcripció que estan correlacionats amb la seva posició dins de CP (Molyneaux et al., 2007). En el nostre cas, ens hem fixat amb 3 factors de transcripció involucrats en la diferenciació neuronal com són: *Satb2*, *Cux1* i *Ctip2* (**figura R.3.3.A**). Les neurones corticocalleses expressen *Satb2*, que és un factor de transcripció que regula l'expressió de gens necessaris per la maduració axonal i la formació de projeccions (Alcamo et al., 2008). *Cux1* és un factor de transcripció que s'expressa en les neurones del còrtex de la capa II-III i controla el desenvolupament de l'arbre dendrític (Cubelos et al., 2015; Cubelos et al., 2010). *Ctip2* és un factor de transcripció que s'expressa en neurones del còrtex de capa IV-V i es troba regulat per *Satb2* i controla la formació de les projeccions axonals (Chen et al., 2008). En la zona intermèdia i la subventricular ens hem fixat amb els marcadors *Pax6* i *Trb2* (**figura R.3.3.A**). *Pax6* és un factor de transcripció que s'expressa en progenitors neuronals presents en la zona subventricular. *Trb2* és un factor de transcripció que s'expressa en progenitors intermedis. D'aquesta manera, en el cas de les cèl·lules deficientes de Ncam2 ens vam centrar en determinar els marcadors en les capes II-III i IV (**figura R.3.3.A i B**). A més a més, en el cas de la sobreexpressió vam analitzar els marcadors expressats en les neurones de la zona intermèdia i subventricular (**figura R.3.3.A, C i D**).



**Figura R.3.3. El canvis d'expressió de Ncam2 poden afectar als marcadors neuronals.**

A) Esquema representatiu dels factors de transcripció que expressen les neurones o els progenitors neuronals. B) Immunodetecció de Cux1, Ctip2 i Satb2 en els cervells electroporats amb els diferents plasmidis d'estudi, control (pWPI) i ShNcam2. Per visualitzar les cèl·lules electroporades s'ha realitzat una immunodetecció de GFP. Els caps blancs de fletxes i les fletxes blanques mostren les cèl·lules que són positives o negatives per a cada marcador, respectivament. El dèficit de Ncam2 tendeix a incrementar el nombre de neurones que són negatives per Cux1 i Ctip2 respecte el control.

C) Immunodetecció de Cux1 dels cervells electroporats amb els diferents plasmidis d'estudi, control (pWPI), sobreexpressió Ncam2.1 i Ncam2.2. Per visualitzar les cèl·lules electroporades s'ha realitzat una immunodetecció de GFP. Els caps blancs de fletxes i les fletxes blanques mostren les cèl·lules que són positives o negatives per un marcador, respectivament. Les neurones posicionades a la placa cortical que sobreexpressen Ncam2.1 i Ncam2.2 expressen el factor Cux1 igual que el control.

D) Les neurones que sobreexpressen Ncam2.1 i que queden retingudes a les zones subventricular i intermèdia presenten marcatge positiu per Cux1 (caps de fletxes J-L) i algunes són també positives per Pax6 (M-O). També són negatives per Trb2 (fletxes P-R). Barra d'escala: 20µm

La majoria de neurones electroporades amb el plasmidi control en el moment de la fixació són positives per Cux1 (**figura R.3.3.B, A-C**). En el control també trobem un petit percentatge de neurones positives per Ctip2 (**figura R.3.3.B, D-F**). D'altra banda, algunes de les neurones que tenen un dèficit de Ncam2 també presenten un marcatge positiu per Cux1 o Ctip2 (**figura R.3.3.B, G-L**). A més a més, les neurones positives pel marcador Cux1 també ho són per Stab2 (**figura R.3.3.B, M-R**). En canvi, trobem neurones amb dèficit de Ncam2 que no expressen ni Cux1 ni Stab2 (**figura R.3.3.B, M-R**). En conjunt, les dades preliminars que tenim suggereixen que el dèficit de Ncam2 tendeix a incrementar en el nombre de neurones negatives pels marcadors corticals Cux1 i Ctip2 respecte el control.

En el cas de la sobreexpressió de Ncam2, tot i que el percentatge de neurones posicionades a les capes II-III està modificat respecte el control, les neurones que estan correctament a la capa cortical expressen Cux1. La sobreexpressió de Ncam2.1 i Ncam2.2 produeixen un posicionament erroni però no observem canvis en el marcatge Cux1 respecte el control (**figura R.3.3.C A-I**).

Troblem neurones que sobreexpressen Ncam2.1 que queden retingudes a la zona subventricular i a la intermèdia (**figura R.3.3.D**). Aquestes neurones presenten marcatge positiu per Cux1 (**figura R.3.3.D, A-C**), són negatives per Trb2 (**figura R.3.3.D, G-I**) i algunes són positives per Pax6 (**figura R.3.3.D, D-F**). D'aquesta manera la modulació de Ncam2 produeix canvis lleus en els marcadors neuronals de les cèl·lules electroporades. Les dades preliminars indiquen que el dèficit de Ncam2 podria alterar el percentatge de cèl·lules positives per Cux1. Aquest percentatge es veuria reduït en el dèficit de Ncam2 respecte el control, però no s'observa un augment de Ctip2 o marcadors de progenitors intermedis.

Les cèl·lules que sobreexpressen Ncam2 localitzades a les capes II-III són majoritàriament Cux1 tot i que el seu posicionament no és el correcte. La sobreexpressió de Ncam2.1 produeix que algunes de les cèl·lules que queden retingudes en zones ventrals expressin marcadors de progenitors i altres siguin Cux1 positives.

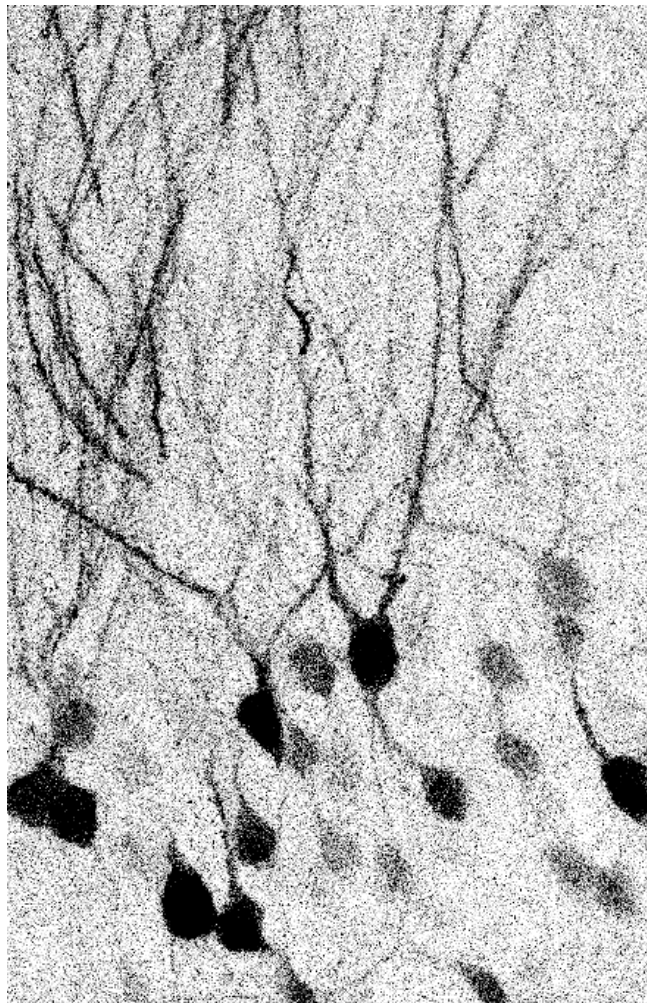
En el primer capítol de resultats hem vist que Ncam2 està expressada en totes les capes del còrtex en desenvolupament. En aquest capítol, hem observat que l'expressió de Ncam2 és clau pel correcte posicionament de les neurones en la formació del còrtex. Falten més experiments per determinar el mecanisme a través del qual Ncam2 intervé en la migració neuronal, però els resultats *in vivo* confirmen la importància de Ncam2 en morfologia i obren la via a implicacions en el procés de migració. Canvis en la seva expressió ocasionen un posicionament erroni de les neurones a dia postnatal 0. La disminució de Ncam2 també podria ocasionar canvis d'expressió de factors de transcripció en les neurones postmitòtiques de capes II-III. S'observen possibles canvis en Cux1 i Stab2, dos factors involucrats en el desenvolupament de l'arbre dendrític i la formació de les projeccions corticocalloses, respectivament. Per tant, Ncam2 també podria regular l'expressió genètica. D'aquesta manera, Ncam2 participa en la migració i diferenciació neuronal durant la formació del còrtex.





## Capítol 4

### El paper de Ncam2 en la plasticitat adulta en l'hipocamp



## 4.1 Ncam2 regula els contactes sinàptics en hipocamp

En els capítols previs, hem observat que Ncam2 participa en processos de migració neuronal i formació de l'arbre dendrític en desenvolupament. A més a més, Ncam2 es continua expressant en moltes regions del cervell adult. La seva funció en el cervell adult està estudiada en bulb olfactori, on està implicada en el manteniment i la formació de sinapsis (Ichinohe et al., 2003), però encara és molt desconeguda la funció que realitza en còrtex i hipocamp. En aquest sentit, la seva expressió en hipocamp és molt elevada i està present en les diferents capes de la CA1 i del gir dentat (**figura R.1.8**).

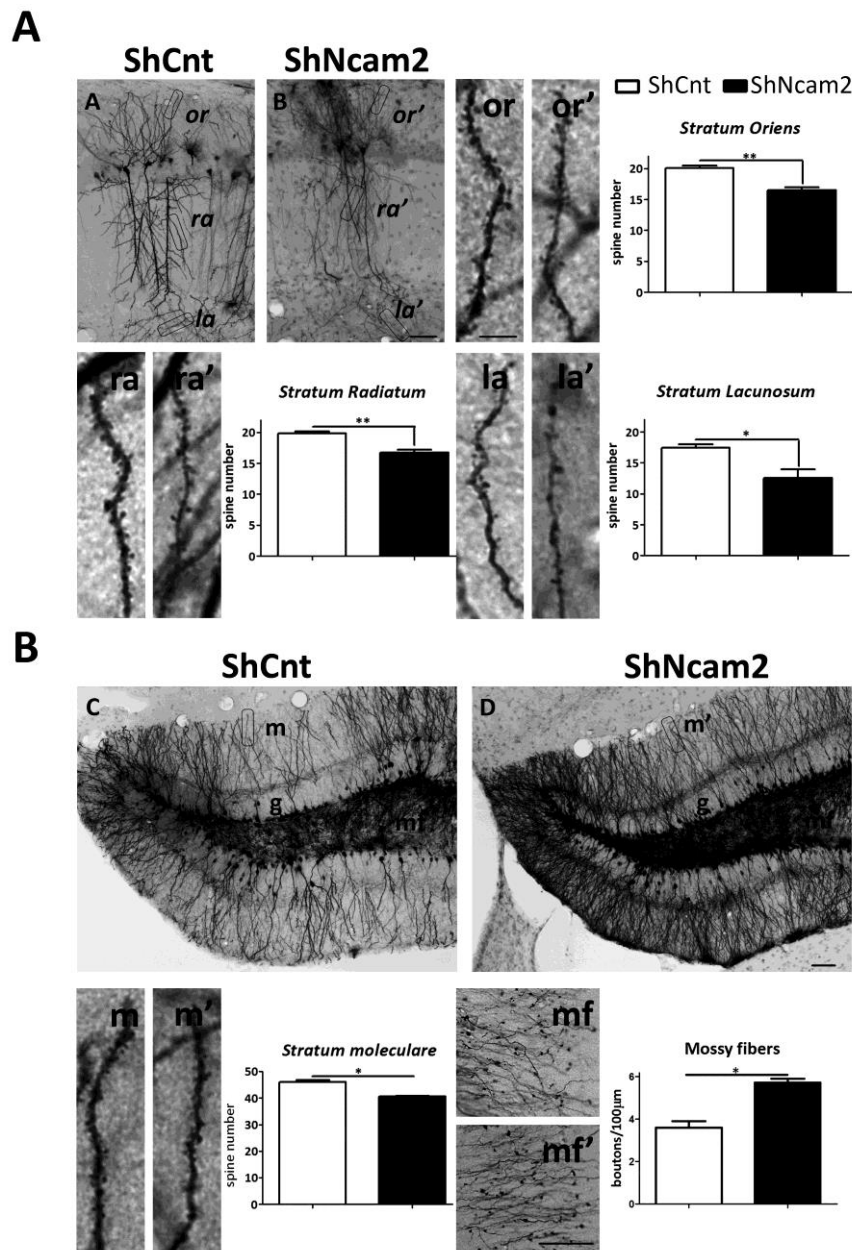
Per comprendre el paper de Ncam2 en hipocamp adult es van realitzar injeccions de virus per modular l'expressió de Ncam2 a diferents zones de l'hipocamp, com són la CA1 i el gir dentat. En aquestes regions, es van utilitzar diferents virus per modular l'expressió de Ncam2 a través de la sobreexpressió específica d'una de les isoformes o el silenciament amb el ShRNA, ShNcam2. A nivell experimental, els animals van ser operats a 8 setmanes d'edat i es van fixar després de 4 setmanes postoperatori.

Les neurones infectades de l'hipocamp coexpressen el ShRNA i GFP, la qual cosa ens permet observar la dendrita i les seves espines. La reducció de Ncam2 no produeix l'aparició de dendrites aberrants ni l'aparició de dendrites ectòpiques (**figura R.4.1**). Ens vam focalitzar en la densitat d'espines, quantificant el nombre d'espines presents en 15µm de les dendrites en les diferents capes. D'aquesta manera, la pèrdua de Ncam2 produeix una reducció del nombre d'espines en la capes *lacunosum moleculare*, *stratum oriens* i *stratum radiatum* de les neurones piramidals de la CA1 (**figura R.4.1.A**). En concret, la disminució del nombre d'espines és pròxima al 25% en les 3 capes. No es va quantificar el tipus de sinapsis ni el gruix de la dendrita, però s'observa una tendència a la reducció de la complexitat de les espines i un aprimament de les dendrites.

Es va seguir el mateix abordatge experimental injectant a la zona del gir dentat. En aquesta zona, la reducció de Ncam2 a les neurones granulars produeix una disminució del nombre d'espines i un increment dels botons de les fibres molsoses (**figura R.4.1.B**). El nombre d'espines va ser analitzat a la regió externa del *stratum moleculare*. Pel recompte de botons sinàptics es va realitzar una immunodetecció de GFP i l'anàlisi de les protuberàncies en l'arbre axonal terminal al seu pas per la zona de la CA3, al *stratum lucidum*. Donat que no es van mirar marcadors de botons presinàptics funcionals, només podem afirmar que Ncam2 produeix un augment del nombre de protuberàncies en l'arbre axonal terminal que es podrien associar a un possible increment de botons sinàptics.

El conjunt de resultats ens indiquen que la disminució de Ncam2 altera les sinapsis en hipocamp produint una reducció del nombre d'espines en les dendrites de les neurones piramidals de CA1, una reducció del nombre d'espines de les neurones granulars del gir dentat, i un increment de la densitat de botons de les fibres molsoses.

A diferència del que passa durant el desenvolupament, on la reducció de Ncam2 afecta a la formació de l'estructura dendrítica i axonal degut a un augment de la inestabilitat del citoesquelet, la disminució en adult no provoca canvis macroscòpics en la morfologia neuronal. En concret, Ncam2 en adult es detecta en els contactes sinàptics (Ichinohe et al., 2003). Per tant, la seva reducció afectaria majoritàriament les estructures presinàptiques i postsinàptiques. En aquest sentit, la reducció podria afectar el citoesquelet de les sinapsis. Així doncs, aquests canvis donarien lloc a un increment del nombre de botons i una reducció del nombre d'espines a nivell presinàptic i postsinàptic, respectivament.



**Figura R.4.1. Efecte del dèficit de Ncam2 en l'hipocamp adult.**

Les neurones piramidals de la CA1 de l'hipocamp es van infectar amb lentivirus control, ShCnt, o amb el ShRNA específic de Ncam2, ShNcam2. A) Aquestes neurones no presenten canvis morfològics a nivell de dendrites A i B. Presenten una reducció del 25% en el nombre d'espines de les diferents capes analitzades, *stratum oriens*, *stratum radiatum* i *stratum lacunosum*. La densitat està representada per nombre d'espines per 15µm.

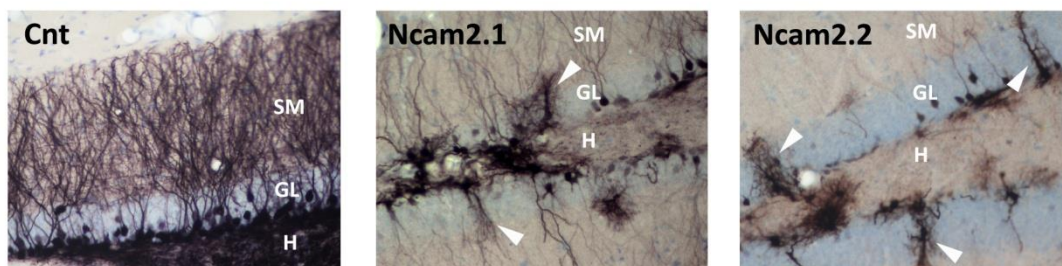
B) La reducció de Ncam2 en les neurones granulars tampoc provoca canvis morfològics a nivell de dendrites, C i D. Les neurones presenten una disminució de les espines dendrítiques en la part externa de la capa molecular. La densitat està representada per nombre d'espines per 20µm. A nivell axonal de les neurones granulars, les fibres molsores presenten un augment dels botons a la zona de la CA3.

Les dades estan presentades com la mitjana ± SEM; t-test; \*p<0.05 i \*\*p<0.01. Abreviacions: g, *stratum granulare*; la, *stratum lacunosum*; m, *stratum moleculare*; mf, *mossy fibers*; or, *stratum oriens*; ra, *stratum radiatum*. Barra d'escala: 50µm A, B, mf i mf'. 10 µm or, or', ra, ra', la, la', m i m'.

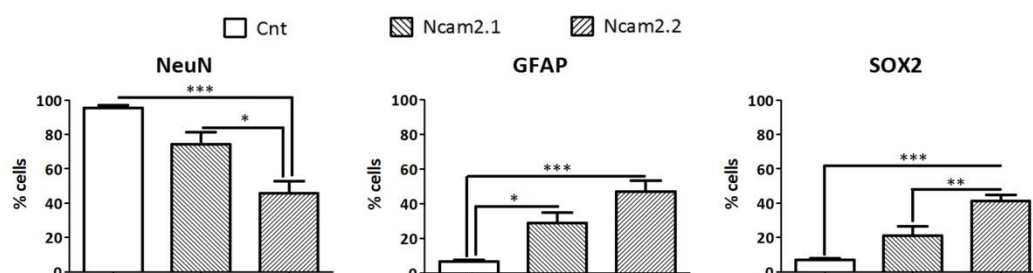
## 4.2 Ncam2 modula la neurogènesi adulta

Paral·lelament a les injeccions per produir un dèficit de Ncam2, també es van operar ratolins amb virus que produïen la sobreexpressió específica de cadascuna de les isoformes de Ncam2 (figura R.4.2). Els virus co-expressen la isoforma de Ncam2 i la proteïna reportera GFP.

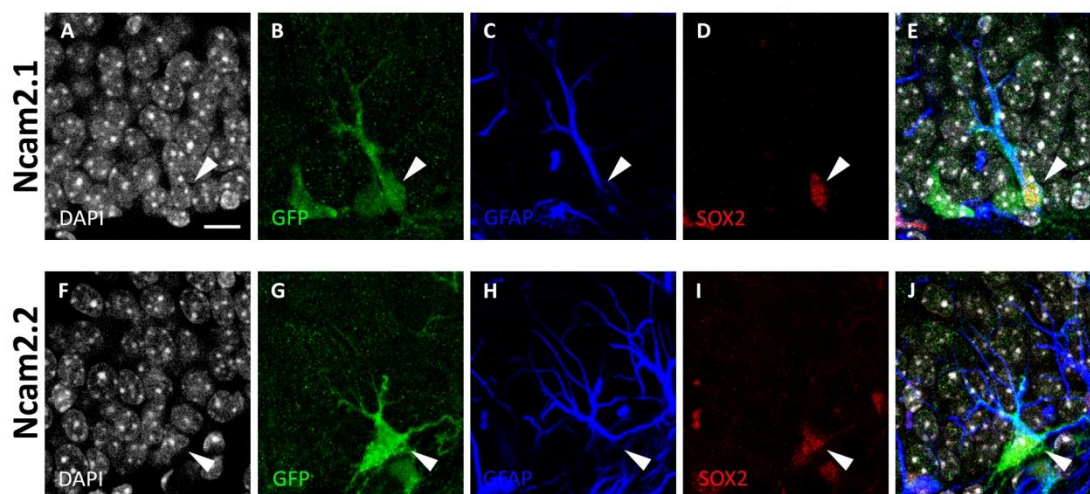
**A**



**B**



**C**



**Figura R.4.2. Efecte de la sobreexpressió de Ncam2 en la neurogènesi adulta d'hipocamp.**

A) La sobreexpressió específica d'una de les dues isoformes de Ncam2 afecta la neurogènesi adulta d'hipocamp i la diferenciació. Després de 4 setmanes postoperatori hi ha cèl·lules que no presenten una morfologia neuronal, caps de fletxes de color blanc. B) Els virus utilitzats coexpressen una isoforma i la proteïna reportera GFP. Realitzant dobles deteccions amb marcadors neuronals observem que en sobreexpressar Ncam2.2 es produeix una reducció significativa de les cèl·lules NeuN positives i un augment de les GFAP i SOX2 positives. En sobreexpressar Ncam2.1 es produeix un augment significatiu de cèl·lules positives per GFAP i una tendència a la disminució i a l'augment de NeuN i SOX2, respectivament. C) Les cèl·lules que es troben a la SGZ de morfologia no neuronal són positives per GFAP i SOX2, marcades amb caps de fletxes de color blanc. Aquestes dades indicarien que la sobreexpressió de Ncam2 reté les cèl·lules en estadi de progenitors neuronals. Les dades estan presentades com la mitjana  $\pm$  SEM; ANOVA Turkey's post hoc test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Abreviacions: GL, *stratum granulare*; H, *Hilus*; SM, *stratum moleculare*. Barra d'escala: 50  $\mu$ m en A i 10  $\mu$ m en C.

Els virus utilitzats són lentivirus, amb una composició de la càpsida que dona lloc a una infecció preferencial per neuroblasts i progenitors. Després de 4 setmanes postinfecció esperariem que la majoria de cèl·lules tinguessin un arbre dendrític desenvolupat i expressessin el marcador NeuN, com correspon a cèl·lules neuronals diferenciades. En realitzar les primeres observacions es van detectar cèl·lules infectades a la zona del gir dentat però, a diferència dels controls, algunes cèl·lules infectades amb la sobreexpressió no presentaven una morfologia neuronal (**figura R.4.2.A caps de fletxes blancs**).

Es tractava de cèl·lules que estaven a la zona subgranular, SGZ, del gir dentat i presentaven unes ramificacions que s'estenien al llarg de la capa granular. A diferència de les neurones controls, les ramificacions no s'estenien a la capa molecular. Per determinar el tipus cel·lular, vam realitzar comptatges amb doble marcatge. Es van analitzar la presència de marcadors de progenitors neuronals, com el factor de transcripció SOX2 o al proteïna GFAP.

La sobreexpressió de Ncam2.2 produeix una reducció significativa del percentatge de cèl·lules NeuN positives i un augment del percentatge de GFAP i del SOX2 positives. La sobreexpressió de Ncam2.2 també produeix un augment significatiu del percentatge de cèl·lules positives per GFAP, així com una tendència a la disminució del percentatge de cèl·lules NeuN positives i a l'augment del percentatge de SOX2 (**figura R.4.2.B**).

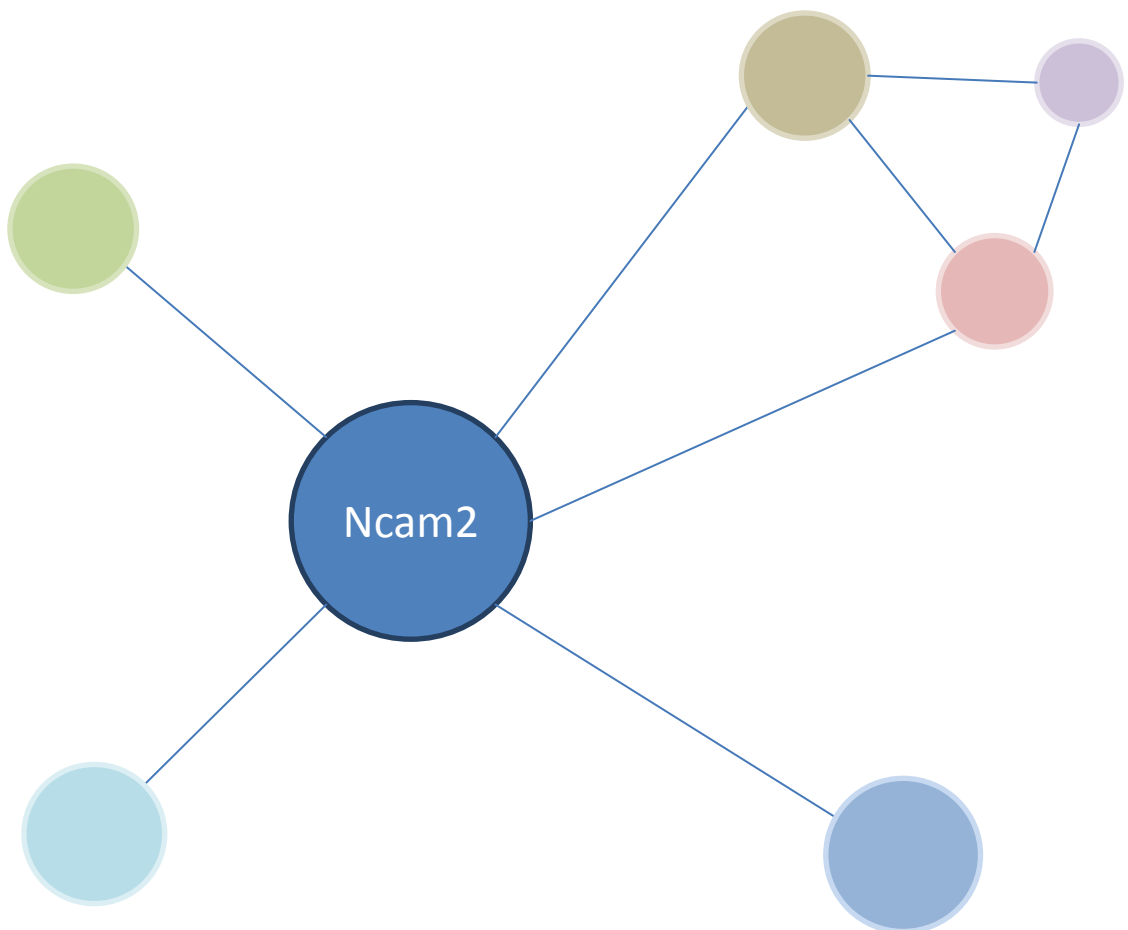
Aquests marcatges i la posició de la cèl·lula ens confirmen la hipòtesi de que són progenitors neuronals. Les cèl·lules que es troben a la SGZ de morfologia no neuronal són majoritàriament positives per GFAP i SOX2 (**figura R.4.2.C**). Les dades obtingudes suggereixen que la sobreexpressió de Ncam2 arresta les cèl·lules en estadi de progenitors.

Les injeccions amb estereotàxia no són quantitatives de valor absolut. No es pot assegurar que, tot i tenir la mateixa titulació de virus, injectant la mateixa quantitat de solució el nombre de cèl·lules infectades sigui el mateix. Hi ha moltes variables que afecten la infecció. Tot i això, qualitativament el nombre de cèl·lules infectades quan es produeix una sobreexpressió d'una de les dues isoformes de Ncam2 sembla ser inferior respecte el corresponent control.



## Capítol 5

### L'interactoma de Ncam2





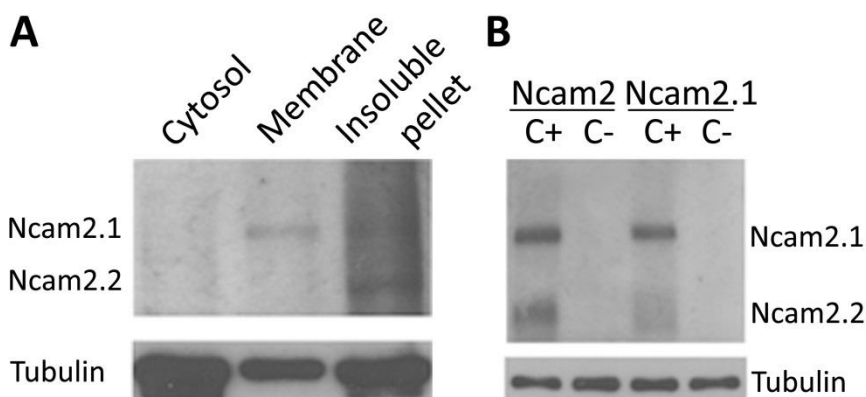
## 5.1 Estudi de l'interactoma de Ncam2 en cervell anterior de ratolí

Ncam2 és una proteïna essencial per la formació i manteniment de les estructures neuronals. Participa en diferents funcions al llarg del desenvolupament, com la migració i la formació de l'arbre dendrític. En el capítol 2, hem vist que la seva funció en formació de l'arbre dendrític recau principalment en la isoforma Ncam2.1. En cervell adult, la seva funció està relacionada en el manteniment de les connexions neuronals.

Tot i que Ncam2 és una molècula estudiada des de fa temps en el bulb olfatori, el seu interactoma era desconegut. En estudis proteòmics de gran abast s'ha trobat alguna interacció amb alguna proteïna de la família de les 14-3-3 i la proteïna priònica (prion protein, Prp)(Collins et al., 2006; Kislinger et al., 2006). En estudis específics de la funció de Ncam2 en neurones corticals s'ha observat la interacció amb Src i indirecte amb CaMKII (Sheng et al., 2015).

Un dels objectius més importants és comprendre el mecanisme a través del qual Ncam2 produeix els canvis descrits al llarg de la tesi i que puguin explicar les funcions descrites. Per aquest motiu, vam analitzar les interaccions de Ncam2 per espectrometria de masses. Les regions utilitzades van ser el còrtex i l'hipocamp de ratolins mascles de 14-15 dies d'edat. Ens vam centrar en aquestes regions perquè són les d'estudi al llarg de la tesi. Ens interessen particularment les interaccions que pot realitzar Ncam2 en elles per comprendre els possibles mecanismes involucrats en els diferents processos descrits en els apartats anteriors.

Primer, vam posar a punt les condicions experimentals i vam comprovar que els anticossos funcionen per immunoprecipitar la proteïna Ncam2 (**figura R.5.1**). Per realitzar les immunoprecipitacions utilitzem dos tampons. El primer (hipotònic), lisa les cèl·lules i el segon dilueix les proteïnes de membrana (**figura R.5.1.A**). Ncam2.1, degut a la seva localització en membranes, es detecta en la fracció de membrana. En la fracció insoluble detectem una major quantitat de Ncam2.2 degut a la seva unió a glicosilfosfatidilinositol. Les immunoprecipitacions es realitzen amb dos anticossos: un específic per la cua citosòlica de Ncam2.1 (KVSNDIIQSKEDDSK), i l'altre de general per les dues isoformes, ja que les dues isoformes tenen el mateix ectodomini. Immunoprecipitant la isoforma Ncam2.1 també es detecta la isoforma Ncam2.2, demostrant la interacció entre les dues isoformes (**figura R.5.1.B**).



**Figura R.5.1. Validació de l'abordatge experimental per immunoprecipitar Ncam2.**

A) Western-blott de Ncam2 amb les mostres obtingudes al llarg del procediment. Per realitzar les immunoprecipitacions utilitzem dos tampons, el primer lisa les cèl·lules i el segon dilueix les proteïnes de membrana. El western-blott que es mostra presenta les mostres obtingudes de la fracció citosòlica, de membrana i la part insoluble amb el segon tampó. Ncam2.1 es detecta en la fracció de membrana. En la fracció insoluble detectem una major quantitat de Ncam2.2 degut a la seva unió a glicosilfosfatidilinositol. B) Les immunoprecipitacions es realitzen amb dos anticossos, un d'específic per la cua citosòlica de Ncam2.1 (KVSNDIIQSKEDDSK) i l'altre de general per les dues isoformes amb reconeixement del domini extracel·lular. Immunoprecipitant la isoforma Ncam2.1 també es detecta la isoforma Ncam2.2 perquè hi ha una interacció entre les dues isoformes.

Per obtenir les mostres per l'espectrometria de masses es van lisar i homogenitzar els cervells amb el tampó hipotònic. Posteriorment, es van extreure les proteïnes de membrana amb el tampó específic. Paral·lelament, els anticossos es van unir a boles magnètiques de forma covalent. Les boles magnètiques es van afegir a la solució rica amb proteïnes de membrana. Posteriorment, es van realitzar tractaments amb urea per trencar les unions no covalents de les proteïnes que interaccionaven amb els anticossos. D'aquesta manera, els anticossos queden retinguts a les boles magnètiques i no emmascaren els resultats. A continuació, les proteïnes es van digerir amb tripsina i es van separar per HPLC. Per a la detecció dels pèptids es va utilitzar un espectròmetre de masses, Orbitrap Velos. Pel control negatiu de l'experiment es va seguir el mateix procediment, fent interaccionar l'extracte de cervell amb boles magnètiques sense cap anticòs.

Del total de proteïnes detectades es van excloure les proteïnes que no eren de *mus musculus*, les que tenien una relació de fals descobriment superior al 0,01% i les que es van detectar al control negatiu. En total, es van detectar 103 proteïnes que complien aquestes restriccions (el llistat total de proteïnes es pot consultar en l'Annex, **taula A.1**). En la **taula R.5.1** es mostren les 52 proteïnes per les quals es van detectar més d'una vegada pèptids específics, també quan es detecta més d'una vegada el mateix pèptid. En aquesta taula, les dades estan ordenades per pèptids únics detectats en el total dels dos experiments, PptsT. La columna Ncam2.1 correspon a les proteïnes detectades en immunoprecipitar amb l'anticòs específic per aquesta isoforma. La columna Ncam2 correspon a les proteïnes detectades en immunoprecipitar amb l'anticòs general de Ncam2. La columna PSMs correspon als pèptids detectats i la columna Ppts, als pèptids únics. Cal tenir present que un pèptid únic es pot haver detectat més d'una vegada, per això tenim algun cas amb el valor més elevat de PSMs respecte el Ppts.

La **taula R.5.2** conté les proteïnes per les quals es va detectar més d'un pèptid específic, però també es detecta algun pèptid en el control negatiu. En aquesta taula cal destacar la subunitat beta de la tubulina. Aquesta proteïna la trobem en aquesta llista tot i estar molt enriquida en immunoprecipitar amb els anticossos de Ncam2.1 i Ncam2 perquè també es detecta algun pèptid en el control negatiu. Les altres proteïnes detectades al control negatiu van ser incloses en la taula de l'**annex A.2**, i només trobem representat els PSMs de les diferents condicions i el total.

		Assay 1				Assay 2			
		NCAM2.1		NCAM2		NCAM2.1		NCAM2	
Protein	Ppts T	Ppts	PSMs	Ppts	PSMs	Ppts	PSMs	Ppts	PSMs
Microtubule-associated protein 2 (Map2)	24	4	5			22	49		
Neurofilament light polypeptide (Nefl)	20	6	6			20	65		
Actin, cytoplasmic 1 (Actb)	19	9	11	1	1	17	72	2	2
Neurofilament medium polypeptide (Nefm)	19	3	3			19	42		
Tubulin beta-4A (Tubb4a)	18					18	63		
Alpha-internexin (Ina)	17	1	1			17	44		
Tubulin alpha-1A (Tuba1a)	13	3	3			13	54	1	2
Tubulin alpha-1C (Tuba1c)	12	3	3					1	2
Actin, alpha cardiac muscle 1 (Actc1)	11	5	5	1	1	10	37		
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II beta (Camk2b)	11					11	33		
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha (Camk2a)	10	1	1			10	34		
Microtubule-associated protein 1B (Map1b)	9					9	22		
Beta-actin-like protein 2 (Actbl2)	8					7	32		
F-actin-capping protein beta (Capzb)	8					8	16		
14-3-3 protein zeta/delta (Ywhaz)	8					8	11	1	1
Tubulin beta-6 chain (Tubb6)	7			1	1				
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta (Camk2d)	6					6	16		
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma (Camk2g)	6					6	16		
14-3-3 protein gamma (Ywhag)	6					6	11	1	1
Enhancer of rudimentary homolog (Erh)	5	2	2			5	24		
Thioredoxin-dependent peroxide reductase (Prdx3)	5	3	4			4	16		
Heat shock cognate 71 kDa protein (Hspa8)	5	4	4	1	1	2	3	1	1
F-actin-capping protein alpha-2 (Capza2)	4					4	8		
Calumenin (Calu)	4	1	1			3	3		
Heat shock factor-binding protein 1 (Hsbp1)	3			1	2	3	12	3	11
Granulins (Grn)	3	2	2	3	4	1	2	3	3
Reticulocalbin-2 (Rcn2)	3					2	4	3	6
Elongation factor 1-beta (Eef1b)	3	2	2			3	7		

14-3-3 protein epsilon (Ywhae)	3					3	5	1	1
Hemoglobin beta-1 (Hbb-b1)	3					3	5		
Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (Ybx1)	3					3	5		
UPF0568 protein C14orf166 homolog (Cn166)	3					3	5		
Elongation factor 1-delta (Eef1d)	3	1	2			2	2		
Dynein light chain 1, cytoplasmic (Dylnl1)	2	1	2			2	3	1	2
Myosin light polypeptide 6 (Myl6)	2					2	7		
Barrier-to-autointegration factor (Banf1)	2					2	6		
Dynein light chain 2, cytoplasmic (Dylnl2)	2	2	3					1	2
60S acidic ribosomal protein P2 (Rplp2)	2	1	1			2	4		
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial (C1qbp)	2	2	3						
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 (Itih3)	2					2	3		
Reticulon-4 (Rtn4)	2					2	3		
Ig kappa chain V-III region PC 2413 (Kv3a5)	1							1	8
Ataxin-10 (Atxn10)	1	1	2			1	3		
Protein LSM12 homolog (Lsm12)	1	1	1			1	3		
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H (Eif3h)	1					1	3		
Annexin A2 (Anxa2)	1	1	1	1	1				
Calmodulin (Calm1)	1			1	1	1	1		
FAST kinase domain-containing protein 2 (Fastkd2)	1					1	2		
Haptoglobin (Hp)	1					1	2		
Hippocalcin-like protein 1 (Hpcal1)	1					1	1	1	1
Ras-related protein Rab-33A (Rab33a)	1					1	1	1	1
Ubiquitin-protein ligase E3B (Ube3b)	1					1	2		

Taula R.5.1. Proteïnes detectades amb més d'un pèptid en l'experiment d'espectrometria de masses.

Les proteïnes estan ordenades per pèptids únics detectats en el total dels dos experiments, PptsT. Entre parèntesis trobem el nom del gen que codifica la proteïna. La columna Ncam2.1 correspon a les proteïnes detectades en immunoprecipitar amb l'anticòs específic per aquesta isoforma. La columna Ncam2 correspon a les proteïnes detectades en immunoprecipitar amb l'anticòs general de Ncam2. La columna PSMs, correspon als pèptids detectats i els Ppts, els pèptids únics. Un pèptid únic es pot haver detectat més d'un cop, per això podem trobar algun valor més elevat de PSMs respecte el PPTS.

En l'espectrometria de masses es detecten més proteïnes utilitzant l'anticòs específic per la isoforma Ncam2.1. Moltes d'aquestes proteïnes són citosòliques, la qual cosa podria indicar la interacció d'aquestes proteïnes amb la cua citosòlica.

Un possible indicatiu de validació interna de la llista obtinguda és la detecció de determinades proteïnes en els dos experiments independents o en els dos anticossos utilitzats.

A nivell de proteïnes detectades en aquest estudi, algunes destaquen per la seva funció a nivell neuronal:

- **Map2:** la proteïna detectada amb un nombre més elevat de pèptids. Una proteïna alterada amb el dèficit de Ncam2 i involucrada en l'estabilitat dels microtúbuls i en la morfogènesi neuronal.
- **Proteïnes de citoesquelet:** trobem proteïnes que formen el citoesquelet d'actina (Actb), els microtúbuls (Tub1a i Tubb4a) i els neurofilaments (Nefl i Nefm). Al llarg de tota la llista també trobem moltes proteïnes associades al citoesquelet d'actina, com CapZ o Miosines, i al citoesquelet de microtúbuls, com dineïnes o Map1B.
- **Família de proteïnes CaMKII:** són una família de proteïnes involucrades en la formació i desenvolupament de l'arbre dendrític i claus en la plasticitat neuronal. CaMKII és un complex proteic format per 12 subunitats. El complex pot ser heterogènic o homogènic degut a la combinació de les diferents subunitats codificades en 4 gens diferents: *Camk2a*, *Camk2b*, *Camk2g* i *Camk2g*. En el nostre estudi hem detectat les 4 proteïnes diferents. Alguns dels pèptids detectats són comuns entre ells però cadascuna té identificat com a mínim un pèptid específic.
- **Família de proteïnes 14-3-3:** detectem la interacció amb diferents membres de la família de proteïnes senyalitzadores 14-3-3: *Ywhaz*, *Ywahg* i *Ywahe*. Algunes interaccions estaven descrites en diferents estudis d'interacció proteica previs. Les diferents proteïnes de la família 14-3-3 formen dímers que s'uneixen proteïnes amb residus serina o treonina fosforilats. A través d'aquestes unions activen diferents vies de senyalització. D'aquesta manera, els diferents membres d'aquesta família participen en molts processos a nivell neuronal, com per exemple les dinàmiques del con de creixement, la modulació del citoesquelet, l'apoptosi i la transcripció (Berg et al., 2003).
- **Proteïnes vinculades a transcripció:** es detecten diferents proteïnes involucrades en la transcripció específica: les diferents subunitats que formen part del complex Eef1 (elongation factor, Eef1b i Eef1d), el factor Erh (Weng and Luo, 2013) o el factor d'iniciació Eif3h. Els factors d'elongació Eef1b i Eef1d formen part del complex Eef1A detectat en espines i involucrats en la transcripció específica en espines (Cao et al., 2014; Cho et al., 2004).
- **Proteïnes d'unió a calci, CREC:** es detecten dues proteïnes de la superfamília de CREC amb unió al calci, Calumenin i Reticulocalbin-2. Calumenin s'ha vist que estaria involucrada en la migració i diferenciació neuronal (Vasiljevic et al., 2012).
- **Hsc70:** és una proteïna que es detecta amb tots els anticossos utilitzats i en els dos experiments independents.  
Hsc70 és una xaperona present en la zona postsinàptica i està involucrada en la endocitosi de les membranes, el reciclatge de les vesícules i l'autofàgia (Mayer and Bukau, 2005; Suzuki et al., 1999).

- **Granulin:** conjuntament amb Hsc70 és una proteïna que es detecta amb tots els anticossos utilitzats i en els dos experiments independents. És una proteïna involucrada en el creixement neurític i fins a l'actualitat no es coneix el receptor que vehicula el seu efecte (Gass et al., 2012; Van Damme et al., 2008). En cervell adult, Granulin regula el nombre d'espines (Petkau et al., 2012).
- **Ataxin 10 i Annaxin A2:** les seves funcions en sistema nerviós estan poc estudiades. Tot i això, són dues proteïnes involucrades en la formació de neurites (Jacovina et al., 2001; Waragai et al., 2006). La pèrdua autosomal d'Ataxin 10 està associada a la ataxia espinocerebelosa (Trikamji et al., 2015). A més a més, està involucrada en la citocinesis (Tian et al., 2015).

Protein	Assay 1			Assay 2		
	-	Ncam2.1	Ncam2	-	Ncam2.1	Ncam2
Keratin, type II cytoskeletal 1 (Krt1)			10	16		
Desmoplakin (Dsp)			5	2		1
Elongation factor 2 (Eef2)				2	2	4
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial (Uqcrh)			1	2	2	3
60S ribosomal protein L23a (Rpl23a)				2	3	1
Myelin basic protein (Mbp)				2	9	4
Tubulin beta-2A chain (Tubb2a)		2	1	1	76	22
Tubulin beta-5 chain (Tubb5)		2	1	1	71	21
Tubulin beta-3 chain (Tubb3)			1	1	32	
Nipped-B-like protein (Nipbl)				1	2	
Junction plakoglobin (Jup)	1		8			

**Taula R.5.2. Proteïnes detectades en l'experiment d'espectrometria de masses.**

Les proteïnes detectades amb almenys un pèptid al control negatiu van ser eliminades de la llista R.5.1. Totes les proteïnes detectades al control negatiu per les quals es van detectar més d'una vegada pèptids específics en els dos experiments es mostren en la llista R.5.2, només trobem representat els PSMs de les diferents condicions i el total.

## 5.2 Anàlisi bioinformàtic de l'interactoma de Ncam2

A partir de la llista de proteïnes obtingudes en els experiments d'immunoprecipitació podem hipotetitzar quines funcions descrites per Ncam2 es poden atribuir a la possible interacció amb determinades proteïnes.

Vam utilitzar la llista de proteïnes de la **taula R.5.1** i l'aplicació bioinformàtica del consorci "**String consortium**" per analitzar les ontologies dels gens (gene ontologies, GOs) i l'Enciclopèdia de gens i genomes de Kyoto (Kyoto Encyclopedia of Gens and Genomes, KEGGs). Es van analitzar les diferents categories de les ontologies dels gens: processos biològics, funcions moleculars i components cel·lulars. Versió String 10.0.

L'aplicació va generar un bitmap (**figura R.5.2**), on es mostren les diferents interaccions existents entre les proteïnes detectades. L'anàlisi sobre la llista ens revela que les diferents proteïnes presenten 112 interaccions prèviament descrites, amb un coeficient d'agrupament del 0,548. La intensitat de les línies a la figura mostren el grau de confiança per a cada interacció. De manera fortuïta s'esperarien únicament 24 interaccions, per tant, la nostra llista presenta un enriquitament significatiu de les interaccions.



**Figura R.5.2. Bitmap de l'interactoma de Ncam2.**

Les proteïnes detectades amb més d'un pèptid per espectrometria de masses van ser analitzades amb l'eina bioinformàtica String 10.0. Les diferents interaccions existents entre les proteïnes detectades es troben representades amb línies de diferent gruix. L'anàlisi sobre la llista ens revela que s'han descrit 112 interaccions entre les diferents proteïnes, amb un coeficient d'agrupament del 0,548. La intensitat de la línia mostra el grau de confiança de cadascuna de les interaccions.

### 5.2.1 Anàlisi d'enriquiment per GOs i KEGGs

En l'anàlisi de les 52 proteïnes per GOs i KEGGs s'ha obtingut enriquiment en moltes vies i processos, suggerint una activitat biològicament rellevant de Ncam2 en molts mecanismes. Alguns d'aquests mecanismes no són neuronals, com per exemple alguns referents a les proteïnes de la família 14-3-3, CaMKIIs o a la proteïna Hsc70. Aquestes proteïnes tenen funcions en el cervell i en altres teixits. Les llistes completes estan detallades a l'**annex (A.3-6)**. Focalitzant l'anàlisi en les vies i processos amb major rellevància a nivell neuronal, els diferents paràmetres GOs i KEGGs que apareixen significativament enriquits són:

#### 5.2.1.1 Processos biològics (GO)

En la llista dels processos biològics enriquits (**taula R.5.3**), observem una correlació entre els processos identificats i les funcions observades al llarg de la tesi. Les vies més enriquides fan referència a l'organització cel·lular, amb diferents GOs (GO:0016043, GO 0022607, GO:0043933 i GO:0071822). A més a més, trobem un enriquiment en processos relacionats amb el desenvolupament, com el procés de neurogènesi (GO: 0048699); el desenvolupament del sistema nerviós (GO: 0007399) i el mesencèfal (GO: 0030901) i el desenvolupament cel·lular i general (GO: 0007275, GO: 0048856, GO: 0048869, GO:0044767 i GO:0048731).

Hem observat que Ncam2 està involucrada en la formació de l'arbre dendrític i el terminal axonal. En aquest sentit, la llista està enriquida amb diferents processos involucrats en diferenciació (GO: 0030154), regulació de la morfogènesi (GO: 0010769, GO:0032535 i GO: 0022604), regulació de la formació de projeccions neuronals (GO: 0030030 i GO: 0031175) i formació i manteniment de l'axó (GO:0031133 i GO:0050770). A més a més, trobem un enriquiment en vies associades al citoesquelet de neurofilaments (GO: 0060052 i GO:0045110), el transport (GO: 0046907) i l'elongació transcripcional (GO:0006414).

Biological Process	pathway description	genes	false discovery rate
GO:0016043	cellular component organization	(23) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1a, Tuba1c, Camk2a, Map1b, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Grn, Rcn2, Dynll1, Dynll2, Rtn4, Eif3h i Calm1	0.00322
GO:0021762	substantia nigra development	(4) Actb, Ina, Ywhae i Dynll1	0.00322
GO:0022607	cellular component assembly	(14) Nefl, Nefm, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, C1qbp, Atxn10, Anxa2 i Eif3H	0.00322
GO:0060052	neurofilament cytoskeleton organization	(3) Nefl, Nefm i Ina	0.00322
GO:0065003	macromolecular complex assembly	(11) Nefl, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Camk2d, Camk2g, C1qbp, Atxn10, Eif3h i Anxa2	0.00608
GO:0044085	cellular component biogenesis	(14) Nefl, Nefm, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Capzb, Ywhaz, Camk2d, Camk2g, C1qbp, Atxn10, Eif3h i Anxa2	0.00674
GO:0046907	intracellular transport	(11) Nefl, Nefm, Camk2a, Map1b, Ywhaz, Ywhag, Ywhae, Dynll1, Dynll2, Anxa2, Rab33a	0.00674
GO:0007017	microtubule-based process	(8) Map2, Nefl, Nefm, Tubb4a, Tuba1c, Tubb6, Map1b, Dynll2	0.00697
GO:0071822	protein complex subunit organization	(11) Nefl, Nefm, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Hspa8, Atxn10, i Anxa2	0.00797
GO:0000082	G1/S transition of mitotic cell cycle	(4) Camk2a, Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.0128
GO:0006414	translational elongation	(3) Eef1d, Eef1b2 i Rplp2	0.0128
GO:0030901	midbrain development	(4) Actb, Dynll1, Ywhae i Ina	0.0138



GO:0007275	<b>multicellular organismal development</b>	(21) Actb, Nefm, Ina, Actc1, Camk2b, Map1b, Capzb, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Calu, Hsbp1, Grn, Ybx1, Dynll1, Myl6, Dynll2, Rtn4, Atxn10, Anxa2, Hp	0.014
GO:0032535	<b>regulation of cellular component size</b>	(6) Nefl, Nefm, Map1b, Capzb, Capza2 i Rtn4	0.014
GO:0010769	<b>regulation of cell morphogenesis involved in differentiation</b>	(6) Nefl, Nefm, Map1b, C1qbp, Camk2b i Rtn4	0.0149
GO:0009987	<b>cellular process</b>	(37) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Map1b, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Hsbp1, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Calm1, Hp, Hpcal1, Rab33a i Ube3b	0.0153
GO:0006461	<b>protein complex assembly</b>	(9) Nefl, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Atxn10 i Anxa2	0.0156
GO:0048699	<b>generation of neurons</b>	(11) Nefl, Nefm, Camk2b, Map1b, Ywhag, Ywhae, Calu, Dynll1, Dynll2, Rtn4 i Atx10	0.0156
GO:0070271	<b>protein complex biogenesis</b>	(9) Nefl, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Atxn10 i Anxa2	0.0156
GO:0022604	<b>regulation of cell morphogenesis</b>	(7) Nefl, Nefm, Camk2b, Capzb, Map1b, Rtn4 i Atxn10	0.0176
GO:0014012	<b>peripheral nervous system axon regeneration</b>	(2) Calu i Nefl	0.0208
GO:0030030	<b>cell projection organization</b>	(9) Map2, Nefl, Tubb4a, Map1b, Capzb, Calu, Dynll1, Rtn4 i Atxn10	0.0208
GO:0045110	<b>intermediate filament bundle assembly</b>	(2) Nefl i Nefm	0.0208
GO:0048869	<b>cellular developmental process</b>	(18) Nefl, Nefm, Capzb, Map1b, Ina, Camk2b, Camk2g, Calu, Ywhae, Ywhag, Dynll1, Dynll2, Erh, Rtn4, Hsbp1, Prdx3, Atxn10 i Anxa2	0.0208
GO:1902582	<b>single-organism intracellular transport</b>	(9) Nefl, Nefm, Map1b, Camk2a, Ywhae, Ywhag, Ywhaz, Dynll1, Anxa2	0.0208
GO:0007399	<b>nervous system development</b>	(13) Nefl, Actb, Camk2b, Capzb, Camk2g, Map1b, Ina, Ywhag, Calu, Dynll1, Dynll2, Rtn4 i Atx10	0.0216
GO:0010970	<b>microtubule-based transport</b>	(4) Nefl, Nefm, Dynll1 i Map1b	0.0216
GO:0031133	<b>regulation of axon diameter</b>	(2) Nefl i Nefm	0.0235
GO:0031175	<b>neuron projection development</b>	(7) Map2, Nefl, Capzb, Map1b, Calu, Rtn4 i Atxn10	0.0235
GO:0034622	<b>cellular macromolecular complex assembly</b>	(7) Nefl, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, C1qbp i Eif3h	0.0235
GO:0030154	<b>cell differentiation</b>	(17) Nefl, Nefm, Capzb, Map1b, Ina, Camk2b, Camk2g, Calu, Ywhae, Ywhag, Dynll2, Erh, Rtn4, Hsbp1, Prdx3, Atxn10 i Anxa2	0.0263
GO:0048856	<b>anatomical structure development</b>	(20) Nefm, Actc1, Actb, Capzb, Map1b, Grn, Ina, Camk2b, Camk2g, Calu, Ywhag, Dynll2, Myl6, Rtn4, Hsbp1, Ybx1, Prdx3, Hp, Atxn10 i Anxa2	0.0297
GO:0065008	<b>regulation of biological quality</b>	(15) Nefl, Nefm, Capzb, Map1b, Camk2b, Camk2a, Ywhaz, Ywhae, Ywhag, Dynll1, Erh, Ybx1, Prdx3, Rtn4 i Anxa2	0.0305
GO:0048731	<b>system development</b>	(18) Nefm, Actc1, Actb, Ina, Capzb, Map1b, Camk2b, Camk2g, Calu, Ywhag, Dynll2, Dynll1, Myl6, Rtn4, Prdx3, Hp, Atxn10 i Anxa2	0.0345
GO:0050770	<b>regulation of axonogenesis</b>	(4) Nefl, Nefm, Map1b i Rtn4	0.0345
GO:0044767	<b>single-organism developmental process</b>	(21) Nefm, Actc1, Actb, Capzb, Map1b, Grn, Ina, Erh, Camk2b, Camk2g, Calu, Ywhag, Dynll2, Myl6, Rtn4, Hsbp1, Ybx1, Prdx3, Hp, Atxn10 i Anxa2	0.0372

**Taula R.5.3 Processos biològics enriquits en l'anàlisi d'ontologies del gen.**

Selecció dels processos biològics més rellevants a nivell neuronal que s'han detectats amb un enriquiment en l'anàlisi de GO sobre el llistat de proteïnes interactores amb Ncam2. L'anàlisi s'ha realitzat amb les proteïnes de la taula R.5.1. Cada procés té associat un nombre de gens, entre parèntesi, i un llistat amb les abreviacions dels gens. Programa de "String consortium" versió 10.0.

### 5.2.1.2 Funcions moleculars (GO)

Les principals funcions moleculars enriquides (**taula R.5.4**) són a nivell estructural (GO: 0005200, GO:0005198, GO:0005519 i GO:0008092) i d'unió a RNA i transcripció (GO:0003723, GO:0044822 i GO:0008134).

Molecular function	pathway description	genes	false discovery rate
GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	(5) Nefl, Tuba1c, Tubb4a, Tuba1a i Tubb6	8.22e-05
GO:0003723	RNA binding	(15) Map2, Ywhaz, Erh, Hspa8, Grn, Eef1b, Ywhae, Ywhag, Ybx1, Eef1d, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Anxa2, Fastkd2	0.000136
GO:0044822	poly(A) RNA binding	(13) Map2, Ywhaz, Erh, Hspa8, Grn, Ywhae, Ywhag, Ybx1, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Anxa2, Fastkd2	0.000195
GO:0005198	structural molecule activity	(9) Nefl, Nefm, Tuba1c, Tubb4a, Tuba1a, Tubb6, Ina, Myl6 i Rplp2	0.000201
GO:0004683	calmodulin-dependent protein kinase activity	(4) Camk2b, Camk2a, Camk2d i Camk2g	0.000279
GO:0003674	molecular_function	(39) Map2, Nefl, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Map1b, Actb12, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Erh, Prdx3, Hspa8, Grn, Rcn2, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Dynll1, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Itih3, Rtn4, Eif3h, Calm1, Hp, Hpcal1, Rab33a i Ube3b	0.000865
GO:0005519	cytoskeletal regulatory protein binding	(2) Map2 i Map1b	0.00193
GO:0017111	nucleoside-triphosphatase activity	(9) Hspa8, Dynll2, Dynll1, Tuba1c, Tubb4a, Tuba1a, Tubb6, Rab331 i Myl6	0.00222
GO:0005515	protein binding	(23) Map2, Nefl, Actb, Tuba1a, Actc1, Camk2b, Camk2a, Map1b, Capzb, Ywhaz, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Dynll1, C1qbp, Anxa2, Calm1 i Hp	0.00462
GO:0035639	purine ribonucleoside triphosphate binding	(13) Actb, Tuba1a, Actc1, Actb2, Camk2b, Tuba1c, Tubb4a, Tubb6, Camk2a, Camk2d, Camk2g, Hspa8 i Rab33a	0.00863
GO:0030235	nitric-oxide synthase regulator activity	(2) Calm1 i Dynll1	0.0115
GO:0003924	GTPase activity	(5) Tuba1a, Tuba1c, Tubb4a, Tubb6, i Rab33a	0.0116
GO:0003676	nucleic acid binding	(17) Map2, Actb, Ywhaz, Ywhag, Erh, Hspa8, Grn, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Banf1, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Fastkd2 i Anxa2	0.0157
GO:0008092	cytoskeletal protein binding	(7) Map2, Actb, Actc1, Capzb, Map1b, Camk2d i Ywhag	0.0157
GO:0043168	anion binding	(15) Actb, Tuba1a, Tubb4a, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Actc1, Actb12, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Prdx3, Hspa8, Ywhae i Rab33a	0.0157
GO:0042802	identical protein binding	(9) Actb, Nefl, Ywhaz, Dynll1, Camk2a, Camk2b, Camk2g, Camk2d i Prdx3	0.0381
GO:0036094	small molecule binding	(14) Actb, Tuba1a, Tubb4a, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Actc1, Actb12, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Hspa8, Ywhae i Rab33a	0.0425
GO:0019904	protein domain specific binding	(6) Tuba1a, Hspa8, Dynll1, Ywhaz, Ywhae i Ywhag	0.0437
GO:0008134	transcription factor binding	(6) Hspa8, Actb, Ywhaz, Eef1d, C1qbp i Ybx1	0.0481

**Taula R.5.4 Funcions moleculars enriquides en l'anàlisi d'ontologies del gen.**

Selecció de les funcions moleculars més rellevants detectades amb un enriquiment en l'anàlisi de GO. L'anàlisi s'ha realitzat amb les proteïnes de la taula R.5.1. Cada funció té associada un nombre de gens, entre parèntesi, i un llistat amb les abreviacions dels gens. Programa de "String consortium" versió 10.0.

### 5.2.1.3 Components cel·lulars (GO)

La llista de components cel·lulars enriquits (**taula R.5.5**) conté components del citoplasma, de la membrana i de la part extracel·lular. En aquest sentit, l'enriquiment amb proteïnes de la part extracel·lular ens indica que Ncam2 podria estar actuant de receptor, com per exemple en el cas de Granulin.

A nivell neuronal destaca la detecció d'una gran quantitat de components enriquits que s'associen a la regió postsinàptica i les sinapsis (GO: 0097481, GO: 0014069, 0098794 i GO:004502). A més a més, un component molt enriqueït és l'associat a mielina (GO:0043209).

De manera més general, la llista està enriquida amb proteïnes de projecció cel·lular (GO:0042995, GO:0044463 i GO:0043005) i del citoesquelet o associades al citoesquelet (GO:0005856, GO: 0044430, GO: 0005883, GO:0005874, GO:0015630 i GO: 0005875).

Cellular Component	pathway	genes	false discovery rate
GO:0042995	cell projection	(20) Map2, Nefm, Tubb4a, Actc1, Camk2b, Camk2a, Map1b, Capzb, Camk2d, Camk2g, Hspa8, Capza2, Ywhae, Myl6, Dynll1, C1qbp, Rtn4, Atxn10, Calm1 i Anxa2	1.08e-08
GO:0043209	myelin sheath	(10) Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Prdx3, Hspa8, Capza2, Rtn4 i Anxa2	1.08e-08
GO:0097481	neuronal postsynaptic density	(7) Map2, Nefm, Camk2b, Camk2a, Map1b i Camk2g	5.04e-08
GO:0005856	cytoskeleton	(19) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Map1b, Actbl2, Capzb, Tubb6, Capza2, Hsbp1, Ywhae, Dynll1, Myl6, Dynll2 i Calm1	1.76e-07
GO:0070062	extracellular exosome	(22) Actb, Tubb4a, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, whag, Erh, Prdx3, Hspa8, Capza2, Grn, Ywhae, Ybx1, Dynll1, Myl6, Banf1, Rplp2, C1qbp, Itih3, Rtn4, Eif3h, Anxa2, Hp i Hpcal1	2.73e-07
GO:0014069	postsynaptic density	(8) Map2, Nefm, Camk2b, Camk2a, Ywhaz, Map1b i Camk2g	6.53e-07
GO:0031982	vesicle	(24) Actb, Tubb4a, Tuba1c, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Grn, Ywhae, Ybx1, Dynll1, Myl6, Banf1, Rplp2, Itih3, Rtn4, Eif3h, Anxa2 i Hp	6.53e-07
GO:0044421	extracellular region part	(24) Actb, Tubb4a, Ina, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Grn, Ywhae, Ybx1, Dynll1, Myl6, Banf1, Rplp2, Itih3, Rtn4, Eif3h, Anxa2 i Hp	1.25e-06
GO:0097458	neuron part	(14) Map2, Nefm, Tubb4a, Camk2b, Camk2ba, Map1b, Camk2d, Camk2g, Ywhae, Dynll2, Rtn4, Ybx1, Atxn10 i Calm1	2.13e-06
GO:0044463	cell projection part	(12) Map2, Nefm, Nefl, Tubb4a, Camk2b, Camk2b, Map1b, Camk2b, Camk2g, Dynll2, Hspa8, Rtn4, i Calm1	7.78e-06
GO:0098794	postsynapse	(8) Map2, Nefm, Camk2b, Camk2a, Ywhaz, Map1b i Camk2g	4.12e-05
GO:0045202	synapse	(10) Map2, Nefm, Camk2b, Camk2a, Ywhaz, Map1b, Hspa8, Camk2d i Camk2g	5.11e-05
GO:0005883	neurofilament	3Nefl, Nefm i Ina	5.78e-05
GO:0044446	intracellular organelle part	(29) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Map1b, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Hspa8, Capza2, Calu, Rcn2, Ybx1, Eef1d, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4, Anxa2 i Calm1	0.000218
GO:0005875	microtubule associated complex	(5) Map2, Ywhae, Map1b, Dynll2 i Dynll1	0.00022
GO:0005853	eukaryotic translation elongation factor 1 complex	(2) Eef1d i Eef1b	0.000243
GO:0043005	neuron projection	(10) Map2, Nefm, Tubb4a, Camk2b, Map1b, Hspa8, Atxn10, Ybx1, Rtn4 i Calm1	0.000312

GO:0005874	<b>microtubule</b>	(7) Map2, Tuba1c, Map1b, Tubb4a, Tubb6, Dynll2 i Dynll1	0.000327
GO:0016528	<b>sarcoplasm</b>	(4) Calu, Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.000348
GO:0015630	<b>microtubule cytoskeleton</b>	(10) Map2, Camk2b, Ywhae, Tuba1c, Map1b, Tubb4a, Tubb6, Dynll2, Dynll1 i Calm	0.00112
GO:0030054	<b>cell junction</b>	(10) Actb, Map1b, Capzb, Camk2a, Camk2d, Hspa8, Ywhaz, Ywhae, Ywhag	0.00243
GO:0030424	<b>axon</b>	(6) Nefl, Nefm, Tubb4a, Camk2d, Ywhae i Hspa8	0.0033
GO:0008290	<b>F-actin capping protein complex</b>	(2) Capzb i Capza2	0.00334
GO:0005925	<b>focal adhesion</b>	(6) Actb, Hspa8, Ywhaz, Ywhae, Ywhag i Rplp2	0.00377
GO:0036477	<b>somatodendritic compartment</b>	(7) Map2, Map1b, Tubb4a, Camk2d, Hspa8, Ybx1 i Atxn10	0.00618
GO:0005615	<b>extracellular space</b>	(9) Grn, Hspa8, Ina, Ywhaz, Actb, Actbl2, Hp, Atxn10 i Anxa2	0.0152
GO:0043025	<b>neuronal cell body</b>	(5) Map2, Camk2d, Hspa8, Tubb4a i Atxn10	0.0263

**Taula R.5.5 Components cel·lulars enriquits en l'anàlisi d'ontologies del gen.**

Selecció dels components més rellevants detectats amb un enriquiment en l'anàlisi de GO. L'anàlisi s'ha realitzat amb les proteïnes de la taula R.5.1. Cada component té associat un nombre de gens, entre parèntesi, i un llistat amb les abreviacions dels gens. Programa de "String consortium" versió 10.0.

### 5.2.1.4 KEGGs

A nivell de KEGGs, es detecten enriquiments de les vies que depenen de les diferents subunitats de CaMKII i la família de 14-3-3 (**taula R.5.6**). A nivell neuronal cal destacar l'enriquiment en la potenciació a llarg temps, clau per la plasticitat adulta; la via de Hippo, important per la morfogènesi neuronal; la via de senyalització de calci, involucrada en desenvolupament neuronal i plasticitat; i el cicle cel·lular, que es podria relacionar amb la neurogènesi adulta.

KEGGs	pathway description	genes	false discovery rate
04722	<b>Neurotrophin signaling pathway</b>	(5) Ywhae, Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00042
04720	<b>Long-term potentiation</b>	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.000431
05031	<b>Amphetamine addiction</b>	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.000431
05214	<b>Glioma</b>	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.000431
04145	<b>Phagosome</b>	(5) Tuba1c, Tubb4a, Actb, Tubb6 i Tuba1a	0.000877
04540	<b>Gap junction</b>	(4) Tuba1c, Tubb4a, Tubb6 i Tuba1a	0.001
04912	<b>GnRH signaling pathway</b>	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.001
04713	<b>Circadian entrainment</b>	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00125
04750	<b>Inflammatory mediator regulation of TRP channels</b>	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00271
04728	<b>Dopaminergic synapse</b>	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00306
04390	<b>Hippo signaling pathway</b>	(4) Ywhae, Ywhag, Yhaz i Actb	0.00579
04020	<b>Calcium signaling pathway</b>	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00987
04012	<b>ErbB signaling pathway</b>	(3) Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.012
04725	<b>Cholinergic synapse</b>	(3) Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.0218
04110	<b>Cell cycle</b>	(3) Ywhae, Ywhag i Ywhaz	0.0275
04310	<b>Wnt signaling pathway</b>	(3) Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.0399

**Taula R.5.6 Vies enriquides segons l'anàlisi de l'Enciclopèdia de gens i genomes de Kyoto (KEGGs)**

Selecció de les vies més rellevants detectades amb un enriquiment en l'anàlisi per KEGGs. L'anàlisi s'ha realitzat amb les proteïnes de la taula R.5.1. Cada via té associada un nombre de gens, entre parèntesi, i un llistat amb les abreviacions dels gens. Programa de "String consortium" versió 10.0..

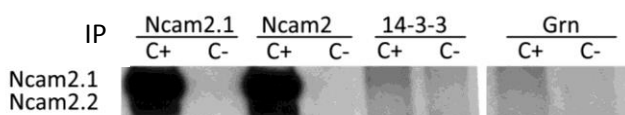
### 5.3 Validacions

Per confirmar que els processos en els quals Ncam2 està involucrada depenen de les interaccions que realitza amb les proteïnes detectades per espectrometria de masses, hem iniciat la validació de les interaccions.

Les interaccions amb diferents membres de la família de proteïnes senyalitzadores 14-3-3 (*Ywhaz*, *Ywhag* i *Ywaha*) són molt interessants, ja que són proteïnes involucrades en dinàmiques de citoesquelet, cycle cel·lular o apoptosi.

Una altre interacció rellevant és Granulin. És una proteïna involucrada en la formació de neurites, per la qual es desconeix el receptor que realitza la funció (Gass et al., 2012). La interacció de Granulina apareix amb els diferents anticossos i els dos experiments independents.

Per realitzar les validacions hem seguit un abordatge experimental igual al descrit prèviament. Les immunoprecipitacions s'han realitzat amb anticossos, un que reconeix les diferents isoformes de 14-3-3 i l'altre que reconeix la proteïna granulin (**figura R.5.3**). En el western-



**Figura R.5.2. Validació de les interaccions de Ncam2 amb les proteïnes 14-3-3 i la Granulin.**

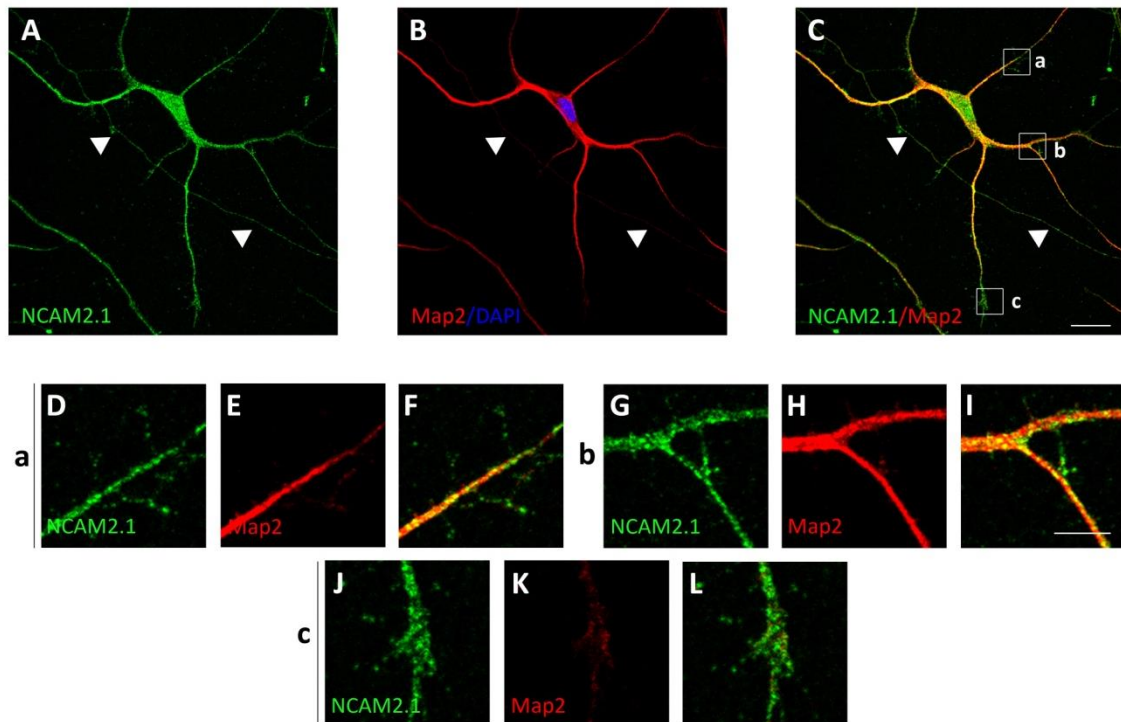
Western-blott de Ncam2 amb les mostres obtingudes de la immunoprecipitació amb anticossos que reconeixen les diferents proteïnes de la família de les 14-3-3, la Granulin (Grn), Ncam2 i Ncam2.1. S'observa una senyal fina a l'altura corresponent a la isoforma Ncam2.1. La senyal ens confirmaria la interacció de les diferents proteïnes 14-3-3 i Granulin amb Ncam2.1. D'aquesta manera obtenim una validació de l'interacció.

blott es mostra la detecció de Ncam2 en mostres immunoprecipitades amb els anticossos per 14-3-3, granulin i els diferents controls interns. S'observa una senyal fina a l'altura corresponent a la isoforma Ncam2.1. La senyal ens confirmaria la interacció de les diferents proteïnes 14-3-3 i Granulin amb Ncam2.1. D'aquesta manera obtenim una validació de la interacció.

Els resultats de masses indiquen la possible interacció de Ncam2.1 amb Map2 i actina. En aquest sentit, vam realitzar co-immunodeteccions de Ncam2.1, la proteïna Map2 o actina, en cultius neuronals embrionaris (**figures R.5.3 i R.5.4**). Per a la detecció de Ncam2.1 es va utilitzar l'anticòs específic de la cua citosòlica de la isoforma Ncam2.1.

En el immunodetecció de Ncam2.1 es pot observar que es marquen totes les prolongacions neuronals, tant en les dendrites com en els axons. Els axons es marquen amb caps de fletxes de color blanques (**figures R.5.3 i R.5.4**). En el cas de la co-immunodetecció de Ncam2.1 amb Map2, observem que Ncam2.1 col·localitza en les dendrites amb el marcatge de Map2 (**figura R.5.3 A-C**). En aquest sentit, Map2 es troba restringida en el compartiment dendrític. Aquest marcatge també serveix per observar el marcatge de Ncam2.1 en axó. En les diferents regions augmentades (**a i b**), observem que Ncam2.1 col·localitza amb Map2 en la zona de la dendrita. S'observen possibles estructures riques amb Ncam2.1 unides a la dendrita principal que tenen un marcatge més feble de Map2.

A més a més, es va analitzat el con de creixement de la dendrita (**figura R.5.3 c**). En aquest sentit, els cons de creixement són estructures molt dinàmiques on trobem una menor quantitat de Map2 en comparació a la zona proximal de la dendrita. En concret, Ncam2.1 es present en el con de creixement de la dendrita i col·localitza amb la poca quantitat de Map2.

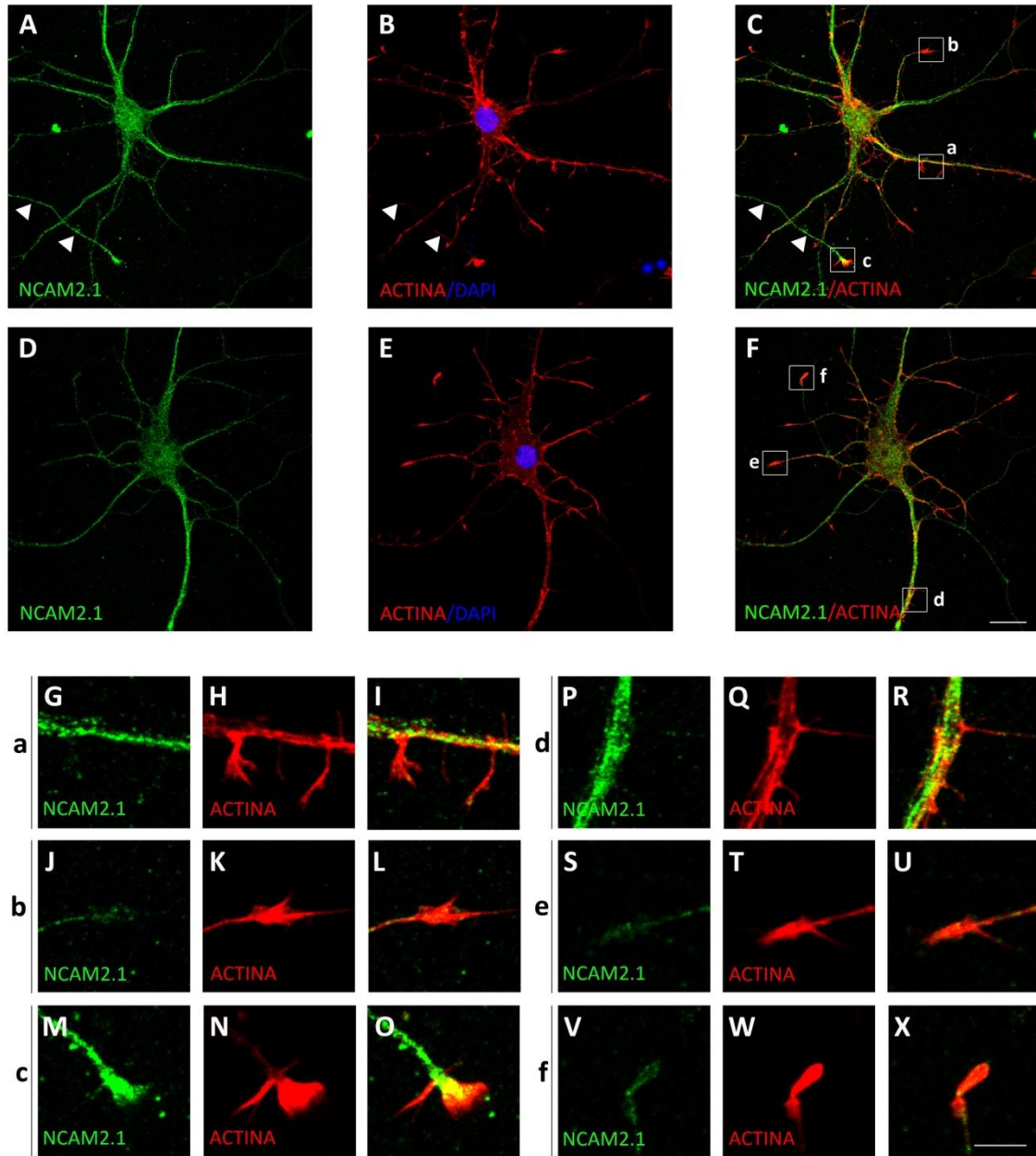


**Figura R.5.3. Ncam2.1 col·localitza amb Map2 en dendrites.**

Co-immunodetecció de Ncam2.1 i Map2 en cultius neuronals de 7DIV. Per visualitzar Ncam2.1 es va utilitzar l'anticòs específic que reconeix la cua citosòlica de Ncam2.1. Map2 es detecta en les dendrites. Per a visualitzar els nuclis cel·lulars s'ha realitzat la co-tinció DAPI. Ncam2 es detecta en dendrites i axó, l'axó està marcat en caps de fletxes blanques. En les dendrites col·localitza amb Map2. En les imatges augmentades s'observa una menor col·localització en les ramificacions que surten de les dendrites (D-I) i el con de creixement (J-L). Barra d'escala 15 $\mu$ m (A-C) i 5 $\mu$ m (D-L).

Si ens fixem en la co-immunodetecció de Ncam2.1 i actina (**figures R.5.4**), observem que la senyala d'actina és més intensa als cons de creixement tant de les dendrites com de l'axó. El con de creixement és una estructura rica amb actina. L'axó està marcat amb caps de fletxes blanques (**A-C**). Ncam2.1 col·localitza amb actina. En concret, a la part central de les dendrites trobem una major quantitat de Ncam2.1 que col·localitza amb actina (**a i d**). En els cons de creixement de les dendrites detectem col·localització amb actina (**b, e i f**). Cal remarcar que Ncam2.1 es troba altament expressada en l'axó i presenta una elevada col·localització amb l'actina (**c**). Per altra banda, en els fil·lopodis trobem una menor quantitat de Ncam2.1 respecte a les dendrites (**a i d**).

Els resultats obtinguts demostren com Ncam2.1 col·localitza amb actina i Map2. Aquesta col·localització és variable segons la regió subcel·lular que analitzem. D'aquesta manera, entre els resultats de masses i de les immunodeteccions demostren la interacció de Ncam2 amb Map2 i actina.



**Figura R.5.4. Ncam2.1 col·localitza amb actina en cons de creixement i dendrites.**

Co-immunodetecció de Ncam2.1 i actina en cultius neuronals de 7 DIV. Per visualitzar Ncam2.1 es va utilitzar l'anticòs específic que reconeix la cua citosòlica de Ncam2.1. Actina es detecta en les dendrites i cons de creixement. Per a visualitzar els nuclis cel·lulars s'ha realitzat la co-tinció amb DAPI. Ncam2 es detecta en dendrites i axó, l'axó està marcat en caps de fletxes blanques. Detectem una elevada senyal d'actina en estructures com les dendrites, els fil·lopodis i els cons de creixement. En les dendrites observem una col·localització d'actina amb Ncam2 (a-d). Els cons de creixement són estructures riques amb actina (b-f). E els cons de les dendrites, existeix una col·localització més dèbil de Ncam2 (b, e i f). En el con de creixement axonal, la col·localització és més intensa (c). Barra d'escala 15µm (A-F) i 5µm (G-X).

Al llarg de la tesi, hem observat que Ncam2 és una molècula clau en diferents processos neuronals, com la migració, la polarització, la formació de l'arbre dendrític i el manteniment de les sinapsis. Les dades de l'espectrometria de masses, conjuntament amb el posterior anàlisi bioinformàtic, ens ajuda a comprendre que les funcions que realitza Ncam2 són degudes a un ampli interactoma. L'interactoma de Ncam2 conté moltes proteïnes involucrades en el desenvolupament de la neurona i la regulació de les dinàmiques del citoesquelet, com per exemple la família de proteïnes de CaMKII o la família de les proteïnes 14-3-3. A més a més, s'ha detectat altres proteïnes que posen de manifest una funció de Ncam2 a nivell de receptor/l·ligand, com pot ser Granulin.

Les diferents interaccions que realitza Ncam2 obren un ventall de possibilitats i funcions que encara no s'han confirmat, com per exemple la regulació de la transcripció en dendrites, la regeneració axonal degut a la seva funció en axó o l'efecte en cicle cel·lular.

Un altre aspecte rellevant serà entendre el canvi de localització: com una proteïna amb una funció molt rellevant en morfogènesi neuronal queda restringida en els contactes sinàptics. Entendre quines interaccions i funcions realitza en els contactes sinàptics de cervell adult ajudaran a comprendre la seva funció en plasticitat i com els canvis en la seva expressió poden afectar en les malalties neuronals.





# Discussió

## 1. Corticogènesi i posicionament neuronal

### 1.1 Expressió de Ncam2 durant el desenvolupament neuronal

Ncam2 és una glicoproteïna que presenta dues isoformes: la transmembrana, Ncam2.1, i l'ancorada a membrana, Ncam2.2 (Paoloni-Giacobino et al., 1997). Les dues isoformes s'expressen en l'embrió i en adult en diferents teixits. Cal remarcar que el cervell és el teixit on es troba major expressió respecte als altres (Paoloni-Giacobino et al., 1997; Yoshihara et al., 1997). En cervell adult hem detectat senyal de Ncam2 en les regions del telencèfal de l'hipocamp i el còrtex (**figura R.1.1**). En aquestes regions, detectem que l'expressió de Ncam2 augmenta al llarg del temps. El seu pic d'expressió té lloc als 21 dies i es manté en adult. El patró d'expressió observat en aquestes regions és semblant al descrit per a tot el cervell (Yoshihara et al., 1997), i suggereix funcions diferencials de Ncam2 en desenvolupament i manteniment de l'estructura neuronal en cervell adult. S'ha descrit que diferents molècules d'adhesió neuronals, amb expressions temporalment i quantitativament semblants a Ncam2, es troben involucrades tant en el desenvolupament del sistema nerviós com en el manteniment de les connexions en cervell adult. Aquest és, per exemple, el cas de L1cam o SynCAM (Frei and Stoeckli, 2016; Maness and Schachner, 2007; Yamagata et al., 2003).

En estadis embrionaris, tot i que Ncam2 s'expressa en tot el cervell, l'estudi de la seva funció s'havia focalitzar en el bulb olfatori, on s'ha vist que és clau per la formació de les connexions en el glomèrul (Borisovska et al., 2011; Walz et al., 2006). La funció de Ncam2 en la formació del còrtex i l'hipocamp no estaven estudiades. La seva expressió en aquests teixits s'ha caracteritzat per hibridació *in situ* i immunodetecció (**figures R.1.2-10**). En còrtex, es detecta expressió des de la zona de neurogènesi neuronal (VZ i SVZ) fins a la placa cortical (PC) en formació. En l'hipocamp en formació es detecta també l'expressió en les diferents zones, sent molt intensa en la zona del gir dentat. Tenint en compte les regions on s'expressa Ncam2 durant el desenvolupament, podríem esperar que la pèrdua de Ncam2 originés defectes en la formació del cervell. No obstant, no s'han descrit problemes en el desenvolupament de les estructures corticals en l'animal deficient de Ncam2 de forma constitutiva (Walz et al., 2006). En aquest animal s'han descrit defectes en la formació de connexions del bulb que comporten patrons electrofisiològics anormals en aquesta regió.

### 1.2 Funció de Ncam2 en migració neuronal i diferenciació neuronal

Per estudiar l'efecte de Ncam2 en la formació del còrtex hem utilitzat la tècnica de l'electroporació *in utero* (Nishimura et al., 2012; Tabata and Nakajima, 2001). Aquest abordatge ens permet provocar de forma aguda i específica canvis en els nivells de Ncam2 i evitar els possibles efectes compensatoris. Els plasmidis amb el ShRNA específic per Ncam2, ShNcam2; el control, ShCnt; i els de sobreexpressió de Ncam2.1 i Ncam2.2 van ser electroporats a dia 14,5 de gestació.

Les neurones amb una disminució dels nivells de Ncam2 en el moment que es fixa el cervell no estan posicionades igual que el control. Les neurones generades haurien de posicionar-se en les capes II-III del còrtex en formació, però s'observa una disminució significativa de les neurones amb ShNcam2 respecte el control en aquestes capes (**figura R.3.1**).

Les neurones electroporades amb el plasmidi control es posicionen a la capa II-III i expressen els factors de transcripció Cux1 i Stab2. Stab2 s'expressa en les neurones corticocalloso de

projecció, i és clau en el creixement axonal i la formació de projeccions (Alcamo et al., 2008; Chen et al., 2008; Leone et al., 2008). Cux1 és un factor de transcripció involucrat en la dendritogènesi, sinaptogènesi i regulació de la connectivitat de les neurones de les capes II- III del còrtex (Cubelos et al., 2015; Cubelos et al., 2010). El dèficit de Ncam2 en les neurones que migren també produeix canvis en els factors de transcripció de les capes corticals. En els nostres resultats preliminars, hem vist la tendència que les cèl·lules posicionades ectòpicament presentin absència dels factors de transcripció corticals Stab2 i Cux1 (**figura R.3.3**).

En l'estudi de l'efecte de Ncam2 en la migració neuronal, també ens interessava determinar l'efecte ocasionat per l'augment de l'expressió. En aquest sentit, els nivells de Ncam2 es troben incrementats en el síndrome de Down (Kimura et al., 2007; Makino and McLysaght, 2010), que alhora es caracteritza per presentar una laminació i connectivitat defectuoses del còrtex de les capes II-III (Rakic, 1988). Hem observat que l'augment de Ncam2 produeix que les neurones no estiguin a la mateixa posició que el control en el moment de la fixació del cervell electroporat. Les dades preliminars mostren que la sobreexpressió de Ncam2.1 en neurones de la SVZ genera una retenció d'aquestes en aquesta zona. S'observa un major percentatge de neurones retingudes abans de la capa cortical. Les dades es podran complementar incrementant el nombre d'animals i/o diversificant les edats d'anàlisi post-electroporació per confirmar les observacions realitzades al llarg de la tesi sobre l'efecte de la sobreexpressió de Ncam2.1 i per veure si és un efecte transitori o definitiu.

Per la seva banda, les neurones amb un increment de Ncam2.2 entren a la capa cortical. Tot i això, en el moment de la fixació del cervell les neurones no es troben posicionades igual que el control. Així doncs, Ncam2.2 també afecta a la migració neuronal. Aquesta isoforma, a diferència de Ncam2.1, no té una cua citosòlica, fet que dificulta la senyalització intracel·lular directa i justificaria la diferència de fenotip entre elles.

### **1.3 Mecanisme involucrats en la funció de Ncam2**

#### **1.3.1 Migració**

Ncam2 controla la dinàmica de microtúbuls i la seva estabilitat *in vitro* (figures R.2.8 i R.2.13). De fet, el citoesquelet de microtúbuls i d'actina i les seves dinàmiques són claus en la migració neuronal. En concret, durant l'elongació del procés líder, la nucleoquinesi i la retracció del procés de cua es produeixen reordenacions constants del citoesquelet. En aquest sentit, un excés o un dèficit d'estabilitat de microtúbuls produeix canvis en la corticogènesi (Kawauchi and Hoshino, 2008). Per tant, Ncam2 també podria controlar l'estabilitat i la dinàmica de microtúbuls durant la migració neuronal. Aquestes funcions es veurien afectades amb la modulació de Ncam2. En concret, el dèficit de Ncam2 augmentaria la inestabilitat del citoesquelet provocant una morfologia anormal en les cèl·lules ectòpiques (figura R.3.2).

Així doncs, Ncam2 regularia les dinàmiques del citoesquelet interactuant de manera directa o indirecta, a través de proteïnes com les dineïnes, 14-3-3 i Map1B (Taula R.5.1). Aquestes proteïnes s'han vist involucrades en les dinàmiques de microtúbuls i la migració neuronal. Així doncs, canvis en Map1B provoquen errors en la migració, tant la sobreexpressió (Kawauchi et al., 2005) com el dèficit (Gonzalez-Billault et al., 2005). En concret, Map1B durant la migració controla l'estabilitat del citoesquelet de microtúbuls i la seva reordenació (Kawauchi and Hoshino, 2008).

En l'estudi de l'interactoma de Ncam2 hem trobat diferents proteïnes que estan involucrades en la regulació del complex LIS/NDEL, com la proteïna 14-3-3 $\epsilon$  o les cadenes lleugeres de les dineïnes, Dyll1 i Dyll2 (Taula R.5.1). El complex proteic LIS1/NDEL és clau pel procés de nucleoquinesi en la migració radial a través del control de les dinàmiques de microtúbuls i del posicionament del centrosoma (Hippenmeyer, 2014; Reiner and Sapir, 2013; Tsai and Gleeson, 2005; Vallee and Tsai, 2006). S'ha observat que delecions heterogèniques del gen *Lis1* produeixen lissencefàlia i el síndrome de Miller-Dieker. En aquestes dues patologies es produeixen defectes en la migració neuronal que eviten el correcte posicionament de les neurones i la formació dels plegaments del còrtex (Dobyns et al., 1993). El complex LIS/NDEL interacciona amb diferents proteïnes que en controlen el seu posicionament i la seva activitat: dineïnes, cinesina de divisió cel·lular 5, Aurora A o 14-3-3 $\epsilon$  (Niethammer et al., 2000; Sasaki et al., 2000; Toyo-oka et al., 2003; Yamada et al., 2010). La interacció del complex amb les dineïnes citoplasmàtiques és clau pel posicionament del complex durant la nucleoquinesi (Tsai and Gleeson, 2005; Vallee et al., 2012). L'activitat del complex depèn de la fosforilació. En aquest sentit, la interacció de 14-3-3 $\epsilon$  amb el complex és essencial pel manteniment de la fosforilació de NDEL (Toyo-oka et al., 2003). D'aquesta manera, els animals deficients en la proteïna 14-3-3 $\epsilon$  tenen una migració neuronal errònia, que condueix a un desenvolupament aberrant del cervell molt semblant al fenotip de l'animal deficient de *Lis1* (Gambello et al., 2003; Hippenmeyer et al., 2010; Toyo-oka et al., 2003). El gen que codifica per la proteïna 14-3-3 $\epsilon$ , *Ywhae*, també es troba delecionat en alguns casos de la malaltia de Miller-Dieker (Cardoso et al., 2003). En els estudis de proteòmica presentats, hem detectat la interacció de Ncam2 amb diferents proteïnes que regulen la dinàmica dels microtúbuls, com Map1B, i la funció i el posicionament del complex LIS/NDEL. La possible interacció de Ncam2 amb aquestes proteïnes podria ajudar al posicionament del complex LIS/NDEL i la correcta reordenació del citoesquelet de microtúbuls. Aquests fets justificarien que amb la pèrdua de Ncam2 s'observi un posicionament i una morfologia anormal de les neurones degut a errors durant el procés de migració.

Per altra banda, una sobreexpressió de Ncam2.1 podria dificultar la transició de la neurona de MP a BP, produint una retenció de les cèl·lules en la SVZ i la IZ (**figura R.3.1**). Aquest fet seria degut a una sobreactivació de la senyalització intracel·lular a través de la cua citoplasmàtica. Per produir-se la transició de MP a BP, té lloc una retracció de les neurites que no donen lloc ni al LP ni al TP (Namba et al., 2015). En aquesta retracció es produeix una reordenació del citoesquelet, en la qual participen proteïnes reguladores de les dinàmiques del citoesquelet de microtúbuls i d'actina (Kawauchi, 2012). D'aquesta manera un excés de l'estabilitat dels microtúbuls provocat pel dèficit de reguladors de MAPs, com per exemple el regulador MAPK2, també produeix una retenció de les neurones en la transició de MP a BP (Sapir et al., 2008). Tanmateix, el complex LIS/NDEL torna a ser clau en el posicionament del centrosoma i la definició del LP (Tsai and Gleeson, 2005). A més a més, hem observat que la isoforma Ncam2.1 és essencial pel desenvolupament neuronal, rescatant el fenotip de les neurones silenciades *in vitro* (**figura R.2.4**). Amb les dades obtingudes en l'electroporació, amb l'estudi de l'interactoma i les dades experimentals *in vitro*, podríem hipotetitzar que un excés de Ncam2.1 modificaria la regulació del citoesquelet estabilitzant-lo i evitaria la correcta migració neuronal.

D'altra banda, l'efecte de Ncam2.2 ha de ser degut a interaccions en *cis*, ja que Ncam2.2 és una isoforma ancorada a membrana sense cua citosòlica. En el mateix sentit, la família de les contactines presenten un ancoratge a membrana amb un GPI i són essencials pel desenvolupament neuronal. En el cas de TAG-1 (Contactina 2) és essencial per la corticogènesi, ja que el seu dèficit en neurones evita la transició de MP a BP i l'especificació de l'axó (Namba et al., 2014). El mecanisme a través del qual TAG-1 produeix aquest fenotip es basa en les interaccions en *cis* amb proteïnes de la família Src produïdes en els dominis *lipids rafts* (Kasahara et al., 2002; Kasahara et al., 2000). En el nostre cas, Ncam2.2 té el mateix tipus d'ancoratge en la membrana que TAG-1 i també es localitza en *lipids rafts* (dades no mostrades), però la interacció en *cis* de Ncam2 amb altres proteïnes encara no es coneix, i per tant no podem precisar-ne el mecanisme.

Durant el procés de migració neuronal dependent de glia radial, té lloc un procés d'endocitosi i reciclatge de proteïnes de membrana, com la N-cadherina (Kawauchi et al., 2010), en el qual intervien les diferents proteïnes involucrades amb transport de vesícules, com Rab5 o Rab11 (Jossin and Cooper, 2011; Kawauchi, 2012). A nivell d'interaccions, Ncam2 realitza unions homofíliques (Yoshihara et al., 1997). D'aquesta manera, la sobreexpressió de Ncam2.2 podria impedir el correcte procés d'endocitosi i retardar la migració degut a una possible retenció de les cèl·lules en les zones on hi ha una major presència de Ncam2. Les neurones que es generen el dia de l'electroporació 14,5 han de creuar capes de neurones amb elevada presència de Ncam2.

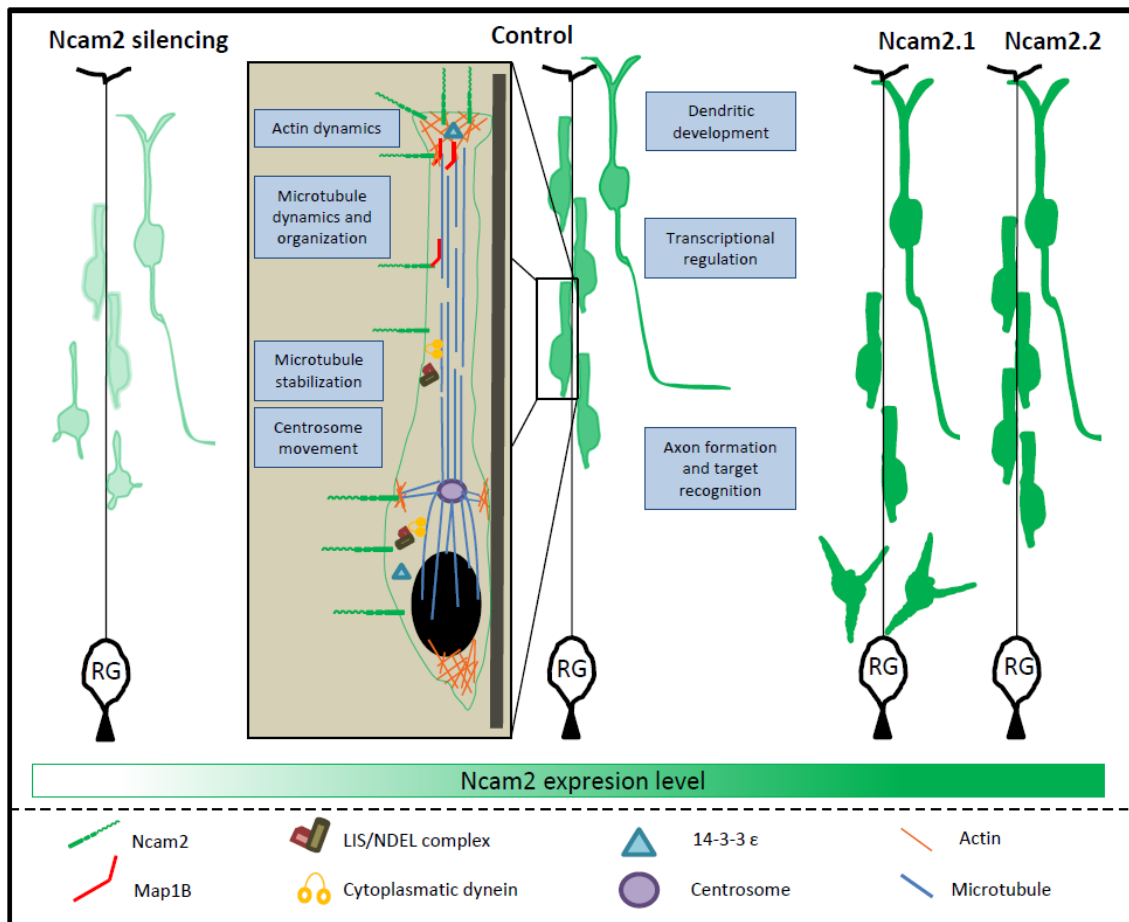
### **1.3.2 Diferenciació neuronal**

Els factors de transcripció regulen la diferenciació neuronal a través d'activitat. Cux1, per exemple, és un factor regulat a través de CREB, que s'activa amb un augment de calci (Li et al., 2000). En aquest sentit, Ncam1 activa la transcripció de proteïnes a través de la cinasa Erk, que controla l'activitat de CREB (Schmid et al., 1999). S'ha descrit que l'activació de Ncam2

augmenta les concentracions de calci en neurones corticals en les dendrites, però no s'ha pogut verificar si també augmenta la concentració de calci en el soma, clau per l'activació de factors de transcripció (Sheng et al., 2015). A falta de més experiments en la senyalització de calci, Ncam2 podria incrementar el calci intracel·lular en el soma produint una activació de factors de transcripció involucrats en la diferenciació neuronal, com Stab2 i Cux1. Si aquesta hipòtesi és correcta, les cèl·lules que no expressen Ncam2 tenen una disminució de Stab2 i Cux1 per falta d'entrada de calci, que produeix que no expressin proteïnes necessàries per la diferenciació i maduració de la neurona. Falten més estudis per identificar quin tipus de factors de transcripció expressen les neurones que no es posicionen adequadament amb la pèrdua de Ncam2 per tal de poder comprendre el possible efecte transcripcional i demostra el retardament en la seva diferenciació.

#### 1.4 Esquema representatiu de la funció de Ncam2 en migració neuronal

Resumint, els resultats observats en la migració neuronal i els possibles mecanismes en els quals està involucrada Ncam2 permeten proposar un model de funcionament de Ncam2 segons queda detallat en el següent esquema (figura D.1):



**Figura D.1. Esquema representatiu de les funcions que realitza Ncam2 en la migració neuronal.**

Ncam2 participa en el procés de migració i posicionament neuronal. Canvis en els nivells de Ncam2 produeixen errors durant la migració neuronal que donen lloc a un posicionament erroni. Aquest posicionament ectòpic podria estar involucrat amb l'estabilitat dels citoesquelets d'actina i de microtúbuls. Els nivells de Ncam2 estan representats segons la intensitat de verd. Les neurones utilitzen la glia radial (RG) com a suport durant la migració

### **1.5 Possibles implicacions patològiques de la funció de Ncam2 en migració neuronal**

El procés de migració és clau per la correcta formació del còrtex, i es troba alterat en diferents patologies neuronals. Per tant, la funció de Ncam2 en la formació del còrtex estaria alterada en pacients que tenen delecions de Ncam2 i que presenten defectes en el desenvolupament del cervell (Petit et al., 2015). Un excés de Ncam2 en malalts pel síndrome de Down i la seva possible funció en migració podrien ser una de les causes en la formació aberrant de les capes corticals (Makino and McLysaght, 2010).

Cal realitzar més experiments per determinar de forma concreta en quins processos i mecanismes està involucrat Ncam2 durant el desenvolupament. La seva expressió al llarg del còrtex en formació, des de les zones de fins les de posicionament, al llarg del desenvolupament conjuntament amb les dades dels experiments *in vivo* posen de manifest una implicació de Ncam2 en la corticogènesi.



## 2. Polarització i formació de l'estructura neuronal *in vitro*

### 2.1 Ncam2 en la polarització i formació de l'arbre dendrític

En el marc del desenvolupament, la formació de l'estructura neuronal a partir d'una cèl·lula postmitòtica engloba diferents processos (Urbanska et al., 2008). Inicialment, els desequilibris en l'homeòstasi de les dinàmiques del citoesquelet de la neurona postmitòtica originen la polarització neuronal (Cheng and Poo, 2012; da Silva and Dotti, 2002). La polarització dóna lloc a la formació de les dendrites i al terminal axonal (Takano et al., 2015). Aquest procés de polarització és intrínsec de la neurona i està modulada a través de les senyals externes. En aquest sentit, les proteïnes de membrana actuen de mediadors amb l'exterior i són claus en el desenvolupament i la diferenciació de la neurona tant *in vivo* com *in vitro* (Namba et al., 2015). Així mateix, s'han descrit diferents proteïnes d'adhesió involucrades en el procés de polarització i diferenciació neuronal (Kawauchi, 2012). En el cas de Ncam2, no s'ha descrit cap funció explícita en la polarització en còrtex o hipocamp. Fins el moment, un estudi vincula l'activació de Ncam2 en neurones corticals amb la formació de neurites (Sheng et al., 2015). En aquest estudi es posa de manifest que una activació de Ncam2 produeix un augment de fil·lopodis i de la longitud de les neurites degut a un increment de calci intracel·lular que activa el complex CaMKII.

En el nostre estudi, basat en neurones hipocampals, hem observat que Ncam2 juga un paper fonamental en la polarització i la formació tant de les dendrites com de l'axó (**figures R.2.3-6**). En concret, la sobreexpressió de Ncam2.1 i Ncam2.2 produeix un augment de la longitud de les dendrites, i la sobreexpressió de Ncam2.1 redueix el nombre de ramificacions. Cal destacar que la pèrdua de Ncam2 en l'estadi 4 de Banker origina una desestructuració progressiva del citoesquelet observable en la morfologia, en els marcadors del citoesquelet i en les seves dinàmiques.

Amb referència a les dendrites, la pèrdua de Ncam2 produeix la retracció de les neurites existents i l'aparició de noves prolongacions des del soma (**figures R.2.9 i 10**). Aquests fenòmens produeixen un augment significatiu del nombre de dendrites primàries (**figura R.2.4**). Tanmateix, aquestes dendrites són més curtes i tenen més punts de ramificació, i a nivell qualitatiu presenten un menor gruix respecte el control. Aquests resultats indiquen que Ncam2 és essencial per la morfogènesi neuronal: la pèrdua d'aquesta proteïna no només implica problemes en l'elongació i ramificació de les dendrites, sinó que també produeix una desestabilització de l'estructura existent.

### 2.2 Ncam2 i l'estabilitat del citoesquelet en dendrites

En l'experiment realitzat amb TAXOL observem una disminució del nombre de dendrites respecte al fenotip provocat pel silenciament de Ncam2 (**figura R.2.12**). El TAXOL és una molècula que s'uneix als microtúbuls i evita la seva despolimerització (Witte et al., 2008). Aquestes dades són compatibles amb una funció de Ncam2 en l'estabilització del citoesquelet de microtúbuls en les dendrites, facilitant el creixement dendrític. D'aquesta manera, el dèficit de Ncam2 redueix l'estabilitat del citoesquelet característica que es reverteixen amb l'adició del TAXOL. Cal remarcar que la pèrdua de Ncam2 produeix una disminució de la quantitat de Map2 (**figures R.2.7 i R.2.8**). Map2 és una proteïna d'unió a microtúbuls que promou la seva formació i estabilització (Al-Bassam et al., 2002), i és clau en la formació de les dendrites (Farah and Leclerc, 2008). Map2 protegeix els microtúbuls de l'acció de la proteïna

desestabilitzadora Katanina (Qiang et al., 2006). En cultius *in vitro* la disminució de Map2 bloqueja la formació i la diferenciació de les dendrites (Caceres et al., 1992). En aquest sentit, l'animal deficient en Map2 presenta una reducció de la longitud de les dendrites (Harada et al., 2002). Concretament, la deleció dels primers 158 aminoàcids de la N-terminal de Map2 és suficient per produir alteracions en l'arbre dendrític de les neurones piramidals de la CA1 (Khuchua et al., 2003). Convé destacar que Map2 és la proteïna amb el major nombre de pèptids únics detectats en l'experiment d'espectrometria de masses (**Taula R.5.1**). A més a més, s'ha observat la col·localització de la cua citosòlica de Ncam2.1 amb Map2 en dendrites (**figura R.5.3**). En aquest sentit, s'ha observat paral·lelismes en l'expressió de Ncam2 i Map2 en el còrtex cingulat, i s'ha hipotetitzat que Ncam2 podria contribuir al desenvolupament dendrític i la connexió de les capes II i V amb la capa I d'aquesta regió (Ichinohe et al., 2008; Ichinohe et al., 2003). Aquesta interacció facilitaria un posicionament de Map2 a dendrites. Així doncs, una pèrdua de Ncam2 podria estar produint una reducció de Map2 en dendrites, alterant la seva formació. En sentit contrari, un increment de Ncam2 potenciarà l'efecte de Map2, que es veuria reflectit en un augment de la longitud dendrítica. És més, hem observat que el rescat de la isoforma Ncam2.1 reverteix els defectes en la formació de l'arbre dendrític ocasionats per la pèrdua dels nivells de Ncam2. Aquest rescat podria ser degut a la interacció amb Map2 a través de la cua citosòlica. D'altra banda es coneix que la proteïna d'adhesió cel·lular L1Cam interacciona amb Map2 a través de la cua citosòlica (Poplawski et al., 2012). A més a més, L1Cam controla la transcripció de Map2 a través de Src i la via MAPK (Poplawski et al., 2012). Es desconeix quin efecte té l'activació de Ncam2 sobre la transcripció proteica però Ncam2 produeix l'activació de Src en cultius corticals *in vitro* (Sheng et al., 2015). Al mateix temps, hem detectat la interacció de Ncam2 amb la proteïna 14-3-3ζ involucrada en el control de l'activitat de Map2 a través de la seva fosforilació (Jansen et al., 2017) i en l'activació de la seva transcripció a través de la via de senyalització PI3K/Akt/NF-κB (Tang et al., 2015).

### **2.3 Mecanismes involucrats en la dendritogènesi**

Hem vist que Ncam2 interacciona a través de la cua citosòlica amb Map2 i la família de proteïnes 14-3-3. Els canvis observats en dendrites es poden relacionar amb aquestes interaccions. En aquest sentit, la família de proteïnes 14-3-3 regulen les dinàmiques del citoesquelet d'actina i microtúbuls (Sluchanko and Gusev, 2010). 14-3-3ζ, per exemple, controla el creixement de les neurites a través del PKA (Kent et al., 2010) o de l'activació de GSK3β (Agarwal-Mawal et al., 2003). En referència a l'interactoma de Ncam2, també hem detectat la interacció amb diferents proteïnes de la família de les CaMKII. Cal remarcar que CaMKIIα i CaMKIIβ, dues subunitats del complex CaMKII, estan involucrades en la morfogènesi neuronal, la formació de neurites i el desenvolupament de l'arbre dendrític. El complex activa diferents vies de senyalització que produeixen modificacions del citoesquelet i activen factors de transcripcions necessaris per la diferenciació neuronal (Fink et al., 2003; Sogawa et al., 2001). En aquest sentit, s'ha demostrat que l'activació de CaMKII a través de diferents molècules d'adhesió és necessària per la diferenciació neuronal (Bodrikov et al., 2008; Williams et al., 1995). Un exemple és la fosforilació de Map2 per CaMKII, que afavoreix la seva unió a microtúbuls (Vaillant et al., 2002). En aquest sentit, Ncam2 produeix l'activació del complex CaMKII en neurones corticals, fet que afavoreix la formació de neurites (Sheng et al., 2015).

Recapitulant, Ncam2 a través de la isoforma Ncam2.1 podria interaccionar amb CaMKII, les proteïnes 14-3-3 i Map2, facilitant l'estabilitat del citoesquelet i la formació de les dendrites. L'activació de Ncam2 també donaria a lloc a una activació de diferents factors de transcripció que produirien l'expressió de proteïnes involucrades en la morfogènesi neuronal, com per exemple Map2, produint d'aquesta manera un bucle que es retroalimentaria facilitant el desenvolupament dendrític de la neurona.

Per altra banda, en l'experiment de masses s'ha detectat la interacció de Ncam2 amb Granulin, una interacció detectada en els dos experiments independents i en les dues condicions experimentals (**Taula R.5.1**). Aquesta proteïna és un factor de creixement que participa en diferents processos biològics, com el desenvolupament, la proliferació tumoral o la inflamació (Bateman and Bennett, 1998). En concret, Granulin promou el creixement de les neurites i la supervivència neuronal (Van Damme et al., 2008). De moment es desconeix el receptor a través del qual Granulin promou el creixement neurític (Gass et al., 2012). La confirmació d'aquesta interacció entre Ncam2 i Granulin podria servir per identificar un receptor de Granulin que realitzi la seva funció en creixement de neurites.

#### **2.4 Ncam2 en el desenvolupament del terminal axonal**

A nivell axonal, el dèficit de Ncam2 incrementa el nombre de ramificacions i redueix la longitud màxima de l'axó principal sense alterar la longitud total de l'arbre axonal (**figura R.2.5**). En el procés de ramificació i elongació del terminal axonal participen diferents mecanismes, alguns d'ells involucrats amb l'estabilitat del citoesquelet (Kalil and Dent, 2014). En aquest sentit, un excés d'instabilitat del citoesquelet de microtúbuls produeix un augment de les ramificacions (Homma et al., 2003). Convé recalcar que el dèficit de Ncam2 produeix una disminució de la senyal de tubulina acetilada en axons, marcador de l'estabilitat del citoesquelet de microtúbuls (**figures R.2.7 i 8**). En concret, l'acetilació de la tubulina és una modificació posttraduccional que només es produeix quan els microtúbuls estan polimeritzats i és una mesura indirecta de l'estabilitat (Garnham and Roll-Mecak, 2012). D'aquesta manera, la disminució de Ncam2 redueix la quantitat de tubulina acetilada, posant de manifest una menor estabilització del citoesquelet de microtúbuls. Es coneixen exemples similars, com la proteïna reguladora de MAPK, la MKP1. Quan es sobreexpressa MKP1 es produeix una disminució de la tubulina acetilada, que produeix una desestabilització del citoesquelet de microtúbuls i causa un augment de la ramificació dels terminals axonals de les neurones corticals (Jeanneteau et al., 2010).

Per altra banda, s'ha identificat Map1B com a possible proteïna que interacciona amb Ncam2. La regulació de la unió de Map1B als microtúbuls és clau durant el procés de ramificació de l'axó i canvia segons el grau de fosforilació (Halpain and Dehmelt, 2006). Paral·lelament, també s'han identificat les possibles interaccions de Ncam2 amb les subunitats lleugera i mitjana dels neurofilaments. Durant el desenvolupament i la neuritogènesi, aquestes dues subunitats formen heterodímers i participen en les dinàmiques de citoesquelet necessàries pel creixement axonal i el transport (Lee and Cleveland, 1996).

Així doncs, la pèrdua de Ncam2 augmentaria la instabilitat del citoesquelet produint un desenvolupament anormal de l'axó, incrementant les ramificacions. Aquest efecte podria ser degut a la interacció directa de Ncam2 amb proteïnes que regulen les dinàmiques del citoesquelet, com les diferents subunitats dels neurofilaments o Map1B, o a través de vies de senyalització que modulen aquesta estabilitat.

### **2.5 Ncam2 en el con de creixement**

Durant la morfogènesi de la neurona, una estructura clau és el con de creixement, localitzat als extrems de les dendrites i l'axó (Dent et al., 2011). A través d'aquesta estructura s'explora el medi extracel·lular. Les senyals externes produeixen modificacions en la dinàmica del con degut a la modulació de les vies de senyalització. En aquest sentit, les molècules d'adhesió són essencials perquè actuen d'enllaç entre el medi extracel·lular, les vies de senyalització i el citoesquelet (Walsh et al., 1997). En relació amb aquest tema, hem observat que la disminució de Ncam2 modifica les dinàmiques del con de creixement (**figures R.2.9 i 10**). En concret, el dèficit de Ncam2 produeix que les prolongacions que surten del soma siguin més dinàmiques i presentin una morfologia aberrant en comparació al control. Els cons de creixement de les neurones amb dèficit de Ncam2 no presenten lamel·lipodis. En aquest sentit, la dinàmica del con de creixement necessita una correcta estructuració del citoesquelet d'actina i microtúbuls (Dent et al., 2011). Ncam2 col·localitza amb actina i Map2 en els cons de creixement (**figures R.5.3 i 4**). Per tant, Ncam2 a través de la interacció amb el citoesquelet d'actina i el de microtúbuls pot ajudar a l'estructuració del con de creixement. De fet, la pèrdua de Ncam2 produeix canvis en l'estructura i les dinàmiques. A més a més de la interacció amb actina hem detectat una possible interacció amb les proteïnes associades actina CapZ $\alpha$  i CapZ $\beta$ , aquesta interacció pot ser rellevant donat que aquestes proteïnes formen part del complex CapZ, que participa en la morfologia del con i la seva funció. En concret, la pèrdua d'una subunitat de CapZ produeix un con aberrant amb una posició ectòpica dels microtúbuls. Aquest fenotip és degut a una pèrdua de la capacitat d'unió de CapZ a la tubulina (Davis et al., 2009). Paral·lelament, Map2 i Map1B són dues proteïnes que interaccionen amb el citoesquelet d'actina i de microtúbuls facilitant l'organització i la funció del con de creixement (Mohan and John, 2015). Els nivells alterats de Map2 amb el dèficit de Ncam2 podrien causar la modificació de les dinàmiques del con de creixement. D'altra banda les proteïnes de la família 14-3-3, que podrien interaccionar amb Ncam2, juguen un paper clau en el con de creixement degut a la regulació del citoesquelet d'actina i microtúbuls (Kent et al., 2010).

Recapitulant, es podria hipotetitzar que Ncam2 participa en el funcionament del con de creixement a través de l'estructuració del citoesquelet d'actina i microtúbuls mitjançant la interacció directa amb diferents proteïnes involucrades en aquesta funció, com MAP2, CapZ, actina o tubulina. Tanmateix, també podria participar en les dinàmiques del con de creixement a través de la regulació de vies de senyalització activades per CaMKII o 14-3-3. Sigui com sigui, el dèficit de Ncam2 produeix una desorganització del con de creixement degut a que s'alteren les dinàmiques del citoesquelet.

### **2.6 Ncam2 en la dinàmiques de microtúbuls**

En relació a les dinàmiques del citoesquelet, hem observat que Ncam2 controla la polimerització de microtúbuls. En aquest sentit, la majoria dels microtúbuls en neurones madures no depenen del centrosoma i es polimeritzen per mecanismes no centrosomals (Kuijpers and Hoogenraad, 2011). Els mecanismes a través dels quals es produeixen aquests fenòmens no es coneixen detalladament, però s'ha proposat que les proteïnes Spastin i Katanin hi estiguin involucrades (Poulain and Sobel, 2010). En relació al procés de polimerització, hem estudiat l'aparició dels cometes utilitzant la proteïna de fusió EB3-Tomato (Stepanova et al., 2003). Hem observat que una reducció de Ncam2 produeix una disminució dels fenòmens de polimerització i augment de la seva longitud (**figura R 2.13**). Les mesures

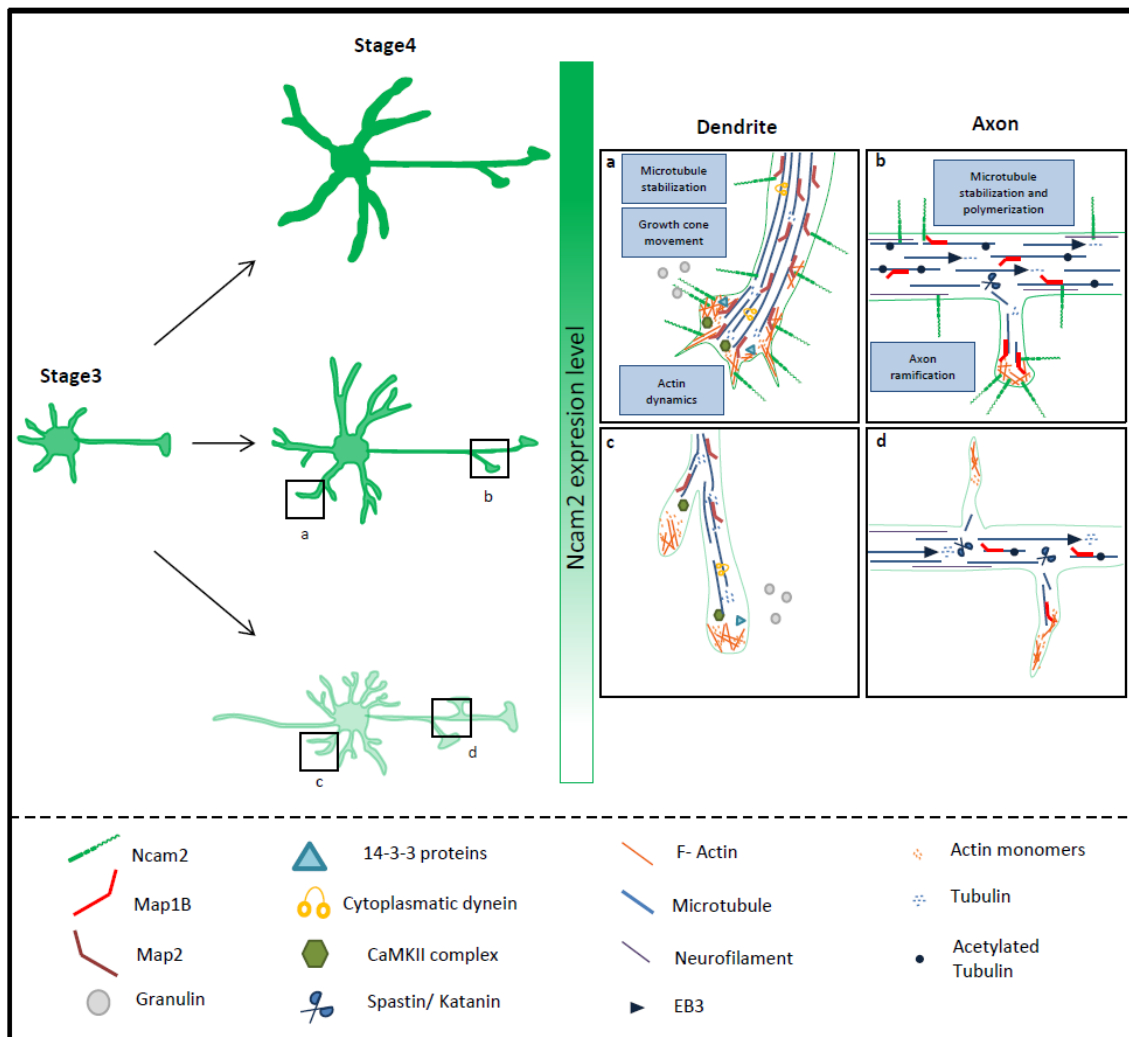
s'han realitzat en el tram axonal de les neurones. En aquest mateix segment, hem observat que la disminució de Ncam2 indueix una reducció de la tubulina acetilada. Aquesta reducció pot ser un indicatiu d'una major presència de tubulina no unida a microtúbuls. L'augment de tubulina lliure produeix que quan es dona el fenomen de polimerització, la longitud del cometa sigui major perquè no hi ha un equilibri en la relació de tubulina polimeritzada i lliure, de manera que l'equilibri es troba desplaçat.

En conjunt, Ncam2 participaria en vies de senyalització que regulen el citoesquelet de microtúbuls afavorint-ne l'estabilització. Aquest mecanisme que s'altera amb la disminució dels nivells de Ncam2 i provoca canvis en les dinàmiques i l'estabilitat dels microtúbuls.

En referència a l'experiment de polimerització dels microtúbuls, hem observat l'aparició de dues estructures proto-axonals en dues neurones que presentaven una disminució de Ncam2. Eren prolongacions de morfologia similar a la dels axons, que sortien del nucli amb una longitud molt superior a les dendrites. En un dels proto-axons, els cometes que presenten una orientació anterògrada suposen més del 90% respecte el total. En canvi, a l'altre proto-axó, els cometes que presenten una orientació anterògrada suposen un percentatge inferior al 75%. En condicions normals, en el fragment axonal el percentatge de cometes que tenen orientació anterògrada és superior al 90% del total (Kuijpers and Hoogenraad, 2011). Una possible explicació d'aquest fenomen seria que la disminució de Ncam2 produeix una desdiferenciació de les dendrites existents, originant un proto-axó a partir d'una dendrita ja formada. Durant la polarització neuronal, les dendrites tenen la capacitat de formar axons en incrementar-se la inestabilitat del citoesquelet d'actina (Bradke and Dotti, 2000). Hem observat que Ncam2 col·localitza amb Map2, i que el dèficit de Ncam2 en les dendrites produeix una reducció de Map2 que afavoriria la transformació del citoesquelet de la dendrita. Els canvis en els nivells de Map2 produeixen canvis en les dinàmiques del citoesquelet, incrementant la inestabilitat del citoesquelet d'actina. Hem descrit la retracció de les dendrites al llarg del temps, de forma gradual, tenen un gruix menor i es produeixen canvis en les dinàmiques del citoesquelet. Algunes dendrites modifica la seva estructura i s'elonga, a diferència de les altres. En aquest sentit, hem observat l'aparició de múltiples estructures proto-axonals en neurones deficientes en Ncam2. En concret un 20% de les neurones deficientes en Ncam2 durant l'estadi 4 presenten més d'un proto-axó.

### **2.7 Esquema representatiu de la funció de Ncam2 en la polarització neuronal**

Globalment, els resultats observats en la morfogènesi neuronal *in vitro* i els possibles mecanismes en els quals està involucrada Ncam2 permeten proposar un model de funcionament de Ncam2 segons queda detallat en el següent esquema (**figura D.2**):



**Figura D.2. Esquema representatiu de les funcions que realitza Ncam2 en la morfogènesi neuronal *in vitro*.**  
 Ncam2 està involucrada en el desenvolupament de l'estructura neuronal *in vitro*. Un dèficit en l'expressió de Ncam2 produeix canvis en l'estabilitat dels citoesquelets d'actina i de microtúbuls. Aquests canvis produeixen errors en el desenvolupament dendrític i axonal. Aquests canvis poden afectar la polarització neuronal. Per altra banda, una sobreexpressió de Ncam2 produeix canvis a nivell de longitud i ramificació dendrítica.  
 Els nivells de Ncam2 estan representats segons la intensitat de verd.

### 2.8 Possibles implicacions patològiques de la funció de Ncam2 en polarització

De forma global, hem observat que Ncam2 és essencial en el procés de morfogènesi neuronal. La seva distribució al llarg de la neurona i les possibles interaccions amb proteïnes que regulen les dinàmiques del citoesquelet fan que participi tant en el desenvolupament de l'arbre dendrític com del terminal axonal. La seva funció es visualitza quan produïm un dèficit, fet que origina canvis en la regulació del citoesquelet. Aquests canvis afecten al con de creixement, a les dendrites i a l'axó. S'haurà de confirmar quina de les proteïnes que interacciona amb Ncam2 és responsable del mecanisme que es desencadena i explorar el possible paper de Ncam2 en l'activació de factors de transcripció involucrats en la diferenciació i maduració neuronal. Aquests canvis estarien relacionats amb patologies neuronals com autisme, on polimorfismes i delecions del gen en *ncam2* s'han associat amb aquesta malaltia. Aquestes modificacions podrien causar defectes en el desenvolupament i formació de l'arbre dendrític (Haldeman-Englert et al., 2010; Molloy et al., 2005; Scholz et al., 2016).

### 3. Plasticitat neuronal adulta

#### 3.1 Manteniment sinàptic

##### 3.1.1 Estructura postsinàptica

Moltes molècules d'adhesió que són rellevants en el desenvolupament del cervell també presenten funcions importants en el manteniment de les sinapsis i la regulació de la plasticitat del cervell adult. En aquest sentit trobem diferents exemples, com Neuroregulin 1, que participa en processos de plasticitat neuronal en hipocamp (Mei and Xiong, 2008), i L1Cam i Ncam1, que participen en processos de plasticitat tant a nivell presinàptic com postsinàptic associats a l'aprenentatge (Sytnyk et al., 2017). En aquest sentit, hem observat que Ncam2 s'expressa en hipocamp adult en totes les regions. La seva funció seria regular l'estructura sinàptica, i podria participar en processos de plasticitat. Les nostres dades mostren que el dèficit de Ncam2 en les regions de CA1 i GD de l'hipocamp provoca una reducció del nombre d'espines en les neurones piramidals i granulars, respectivament (**figura R.4.1**). Estudis realitzats recentment a nivell *in vitro* demostren que la pèrdua de Ncam2 en neurones hipocampals madures produeix una reducció del nombre d'espines funcionals glutamatèrgiques (Leshchyn'ska et al., 2015). En concret en aquest estudi, el tall del domini extracel·lular de la Ncam2 redueix el nombre d'espines, demostrant que la presència de Ncam2 és necessària per mantenir l'estructura d'aquestes. Les nostres dades aporten per primera vegada dades *in vivo* de la funció de Ncam2 en el manteniment i l'estructuració de les espines, i demostren la rellevància fisiològica de Ncam2 en aquesta funció.

Les espines dendrítiques tenen un citoesquelet d'actina. Les proteïnes reguladores de les seves dinàmiques del citoesquelet, doncs, juguen un paper fonamental en el manteniment de la forma i la plasticitat de l'espina (Dillon and Goda, 2005; Yang and Calakos, 2013). En l'experiment de masses hem detectat la possible interacció de Ncam2 amb dues proteïnes del complex CapZ i l'actina. Tot i que la interacció amb actina podria ser indirecta mitjançant CapZ, també podria ser directa com passa amb Ncam1 (Buttner et al., 2003). Retornant a la possible interacció amb CapZ, es coneix que CapZ és una proteïna que estabilitza les fibres d'actina (Edwards et al., 2014), es troba localitzada en la densitat postsinàptica (Yoshimura et al., 2004), i l'activitat neuronal produeix la seva acumulació en les espines, facilitant la remodelació de l'estructura (Kitanishi et al., 2010). Cal remarcar que la pèrdua d'una subunitat del complex CapZ produeix problemes en la formació de les espines i defectes en l'especificació de les estructures presinàptiques i postsinàptiques, que produeixen errors en la neurotransmissió (Fan et al., 2011). En el sentit de la regulació del citoesquelet d'actina, una de les proteïnes involucrades és 14-3-3, que al llarg de la discussió ja hem descrit les seves múltiples funcions.

En referència les dinàmiques d'actina, 14-3-3 és una proteïna que participa en la regulació de la fosforilació de cofilina. Cofilina és una proteïna desestabilitzadora dels filaments d'actina i la seva activitat depèn de l'estat de fosforilació, quan es troba fosforilada no interacciona amb els filaments d'actina (Bamburg, 1999). La proteïna 14-3-3 interacciona amb la forma fosforilada, per tant estabilitza els filaments. Aquesta funció és important per la clusterització dels receptors d'acetilcolina durant la formació de sinapsis (Lee et al., 2009). A més a més, l'animal deficient de 14-3-3 presenta una reducció de la complexitat de l'arbre dendrític i del nombre d'espines associat a la funció de 14-3-3 sobre cofilina (Foote et al., 2015). A nivell de

comportament, l'animal deficient del gen *YWHAE*, que codifica per la proteïna 14-3-3 $\epsilon$ , presenta múltiples problemes de conducta (Wachi et al., 2017) que s'han relacionat amb la susceptibilitat de tenir esquizofrènia (Ikeda et al., 2008). Aquestes dades posen de manifest un possible mecanisme d'acció de Ncam2 sobre l'estructura i la plasticitat de l'espina a través de l'acció de la família de proteïnes 14-3-3 sobre el citoesquelet d'actina.

Una altra proteïna clau en el procés de formació i de plasticitat de les sinapsis és el complex CaMKII. Aquest complex realitza una funció dual a les espines: actua de proteïna estructural, i la seva activació promou la remodelació de l'espina en processos de plasticitat (Okamoto et al., 2009). El complex interacciona amb els filaments d'actina, una funció necessària per mantenir l'estructura de l'espina (Okamoto et al., 2007). La seva activació degut a l'augment de calci intracel·lular produeix la desunió dels filaments d'actina i la remodelació de l'estructura a través de múltiples mecanismes: promou la translocació de receptors AMPA a la membrana, l'activació de diferents membres de les petites GTPases i diferents vies de senyalització (Hell, 2014).

Cal recordar que el citoesquelet de microtúbuls també està present en l'estructura de l'espina. Dues proteïnes MAPs, Map2 i Map1B, estan associades en el manteniment del nombre i la forma de les espines. La reducció de les dues proteïnes ocasiona defectes en l'espina i pèrdua de funcionalitat (Shelton et al., 2015; Tortosa et al., 2011). En aquest sentit, hem observat la col·localització de Ncam2 amb Map2 i a l'experiment de masses també hem trobat la interacció amb les dues proteïnes. D'aquesta manera, aquesta interacció podria contribuir en el fenotip observat: una reducció de Ncam2 condueix una reducció de Map2 que desestabilitza l'espina. A més a més, la possible interacció de Ncam2 amb les dineïnes ajudaria a l'estabilitat del citoesquelet de microtúbuls. De la mateixa manera, Ncam180 interacciona amb la dineïna citoplasmàtica i ajuda l'estabilitat del citoesquelet de microtúbuls en les espines.

Per altra banda, un mecanisme per remodelar les sinapsis és el tall proteolític que realitzen diferents metaloproteases a les molècules d'adhesió. Aquest tall permet la remodelació de les sinapsis a través de la pèrdua de l'unió entre les membranes presinàptiques i postsinàptiques. Aquest mecanisme s'ha descrit per diverses proteïnes de la superfamília de les immunoglobulines, com Ncam1 i L1Cam (Bajor and Kaczmarek, 2013). En el context de la malaltia de l'Alzheimer, s'ha descrit un tall de Ncam2 a la regió extracel·lular, que produeix l'alliberació de la part extracel·lular associat a la reducció del nombre d'espines (Leshchyn'ska et al., 2015).

D'altra banda, hem detectat una interacció de Ncam2 amb diferents components de complexos proteics involucrats en la transcripció específica en espines, com les subunitats eEF1B i eEF1D del complex eEF1. S'ha descrit la interacció en espines de la subunitat eEF1B amb eEF1A2 (Cao et al., 2014), una altra subunitat del complex que és específica d'espines dendrítiques i participa en la transcripció proteica (Abbott et al., 2009). D'aquesta manera, Ncam2 podria participar en processos de plasticitat neuronal a través del control de la transcripció específica en dendrites degut a la interacció amb el complex eEF1.

A diferència de les observacions en el desenvolupament *in vitro*, no hem detectat que la pèrdua de Ncam2 en neurones adultes ja formades produeixi canvis a nivell de morfologia de dendrites. El patró de localització de Ncam2 canvia al llarg de la formació del cervell: primer s'observa al voltant del soma i de la dendrita apical i posteriorment presenta una localització més difusa al llarg de les espines. Aquesta localització podria justificar el fet de no observar



canvis en les dendrites. La possible funció de Ncam2 en les espines es produiria a través del citoesquelet d'actina, de forma directa o indirecta, interactuant amb proteïnes associades a la dinàmica del citoesquelet d'actina com CapZ, cofilina o CaMKII.

Resumint, els nostres resultats demostren que Ncam2 participa en l'hipocamp adult en el manteniment de l'estructura postsinàptica. La dada més rellevant en aquest sentit, és que una reducció de la quantitat de Ncam2 *in vivo* en neurones de CA1 i DG produeix una reducció de la densitat d'espines.

### **3.1.2 Estructura presinàptica**

A nivell axonal, hem observat que el dèficit de Ncam2 en les neurones granulars del GD també produeix un efecte en les projeccions axonals. Aquesta pèrdua produeix un augment dels possibles botons en les fibres molsoses. No podem concloure que augmentin el nombre de botons perquè no hem realitzat un marcatge de botons funcionals. En aquest sentit, es coneix que Ncam2 participa en processos de formació de sinapsis en el bulb olfatori (Yoshihara et al., 1997). En aquesta regió també participa en la fasciculació dels axons (Treloar et al., 2003). S'han descrit processos semblants per L1cam en el sistema visual, on s'ha vist que participa en la fasciculació dels axons de la retina fins a l'escorça visual (Missaire and Hindges, 2015). No es descarta que Ncam2 realitzi funcions semblants en les fibres molsoses, però no hem observat projeccions ectòpiques a la CA3. Les regions presinàptiques també presenten un citoesquelet d'actina, que pateix remodelacions en els processos de plasticitat. Per tant, la interacció de Ncam2 amb el citoesquelet d'actina en el terminal presinàptic també pot influir en aquests processos. A nivell estructural, Map1B juga un paper fonamental en la formació del terminal presinàptic i la seva estabilització. Els microtúbuls formen un llaç al terminal axonal que permet la formació del contacte presinàptic (Conde and Caceres, 2009). Aquest llaç es forma per l'unió de Map1B als microtúbuls que estabilitza l'estructura. S'ha descrit que la unió a microtúbuls depèn de la fosforilació i està regulada per senyals externes (Salinas and Zou, 2008). Com ja hem comentat, Map1B és una proteïna que interacciona també amb el citoesquelet d'actina, necessari en el terminal presinàptic. La interacció de Ncam2 amb Map1B podria justificar l'increment de terminals quan hi ha un dèficit de la proteïna. Una pèrdua de Ncam2 produeix una pèrdua de l'estructuració del citoesquelet de microtúbuls i d'actina a través de Map1B.

A nivell presinàptic, un altre mecanisme rellevant pel correcte funcionament sinàptic és tot el que involucra l'alliberació de vesícules. En aquest procés intervé la proteïna Hsc70, una xaperona clau en el reciclatge de vesícules (Sousa and Lafer, 2015). A nivell patològic, una funció errònia està associada amb malalties neurodegeneratives, ja que evita l'agregació proteica de les proteïnes mal plegades (Fontaine et al., 2015). A nivell funcional, CHL1 és una proteïna d'adhesió de la superfamília de la immunoglobulines que interacciona amb Hsc70 (Leshchyns'ka et al., 2006). A través d'aquesta interacció CHL1 controla el procés de reciclatge de vesícules, i el seu dèficit produeix errors en el reciclatge de les vesícules (Andreyeva et al., 2010). Hsc70 és una proteïna que apareix en tots els experiments independents d'espectrometria de masses i en les dues condicions experimentals. Aquestes dades indicarien una possible funció de Ncam2 en la membrana presinàptica. Falten més experiments per determinar l'efecte de la interacció de Ncam2 i Hsc70, com pot afectar aquesta interacció en el reciclatge de les vesícules, i el funcionament de la terminal presinàptica.

Una proteïna involucrada en el creixement axonal i els processos de plasticitat posttraumatisme és la proteïna reticulon-4, coneguda com a Nogo. Aquesta proteïna bloqueja el creixement neurític per exemple durant el desenvolupament del sistema visual (Pernet and Schwab, 2012). Nogo forma, conjuntament amb MAG i altres proteïnes, la mielina. En hipocamp adult s'ha detectat Nogo en membranes presinàptiques i postsinàptiques (Lee et al., 2008). Les funcions que desenvolupa en aquesta regió són controlar el nombre de sinapsis i modular els processos de plasticitat (Raiker et al., 2010; Zagrebelsky et al., 2010). S'ha detectat Nogo en l'experiment de masses. D'altra banda, la detecció de Ncam2 en els tractes axonals del cos callós podria justificar una interacció amb les proteïnes que formen la mielina, com Nogo. Per altra banda, podria existir una interacció de Ncam2 i Nogo en les sinapsis que regularia els processos de plasticitat.

Les fibres molsoses presenten diferents processos de plasticitat (Castillo, 2012) associats a l'entrada de calci a través dels seus canals. Ncam2 produeix l'entrada de calci en neurones corticals a través de canals VGCC (Sheng et al., 2015). En aquest sentit, els canals VGCC estan involucrats en l'entrada de calci, que facilita els processos de plasticitat a través de la regulació de diferents cinases, com PKA. D'aquesta manera, Ncam2 podria ajudar al control de la plasticitat sinàptica a nivell presinàptic.

### **3.1.3 Possibles implicacions patològiques de la funció de Ncam2 en el manteniment de les sinapsis**

A nivell patològic, els canvis en la densitat i l'estructura de les espines s'han associat en els primers estadis de les patologies neurodegeneratives. Aquests canvis s'han relacionat amb els nivells de les proteïnes d'adhesió. En concret, els nivells de Ncam2 es troben disminuïts en pacients d'Alzheimer (Leshchyns'ka et al., 2015). A més a més, Ncam2 interacciona amb la proteïna Granulin, una de les proteïnes associada a la demència frontotemporal (Cruts et al., 2006; Premi et al., 2013). En aquest sentit, animals deficients de Granulin que s'utilitzen com a models de la demència frontotemporal (Filiano et al., 2013) presenten un dèficit del nombre d'espines (Petkau and Leavitt, 2014). Així doncs, Ncam2 podria ser un receptor de Granulin regulant la seva funció a nivell de espines. Un dèficit de Granulin produiria una desregulació de les sinapsis.

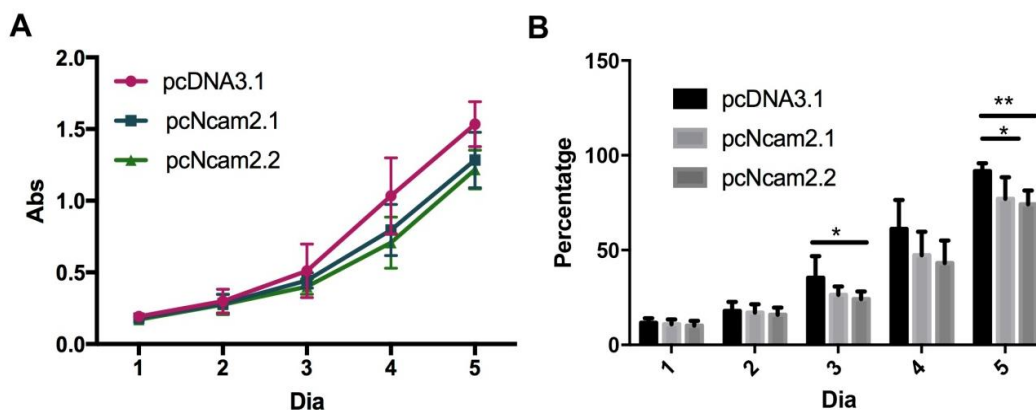
Resumint, Ncam2 participaria a nivell sinàptic en el manteniment de l'estructura presinàptica i postsinàptica. La unió homofílica de Ncam2 en *trans* entre les membranes presinàptiques i postsinàptiques controlaria l'estructura de la sinapsis a través de les interaccions amb el citoesquelet d'actina de manera directe o indirecte. Aquestes interaccions permetrien, així doncs, processos de plasticitat al modificar les dues membranes. Aquests processos de remodelació sinàptica també serien causats per la interacció amb MAPs, Map2 i Map1B. En el cas de Map1B, controlaria la formació del botó presinàptic i postsinàptic. A més a més, en la membrana presinàptica Ncam2 també controlaria el reciclatge de les vesícules a través de Hsc70. Un altre fet a destacar és que Ncam2 podria actuar de receptor de molècules que modifiquen la plasticitat neuronal com Nogo o Granulin. La implicació de Ncam2 en el manteniment i remodelació de les sinapsis produiria l'elevada expressió de Ncam2 en còrtex i hipocamp en estadis postnatals i adults. Tanmateix, canvis en els nivells de Ncam2 estarien associats en els primers estadis de les malalties neurodegeneratives amb una desestructuració de les sinapsis i una reducció de la densitat d'espines.

### 3.2. Neurogènesi adulta

Trobem diferents exemples del control de la neurogènesi a través de molècules d'adhesió, com la L1cam (Dihne et al., 2003) o Ncam1 (Amoureux et al., 2000). Hem observat que la sobreexpressió de Ncam2 produeix canvis en el desenvolupament de les neurones generades en la zona subgranular de l'hipocamp. Les dades obtingudes suggereixen un arrest en l'estadi de progenitors neuronals (**figura R.4.2**). En concret, després de 4 setmanes postoperació les cèl·lules infectades haurien de diferenciar-se i expressar factors de transcripció de neurona madura, com NeuN (Kempermann et al., 2015). En canvi, la sobreexpressió de Ncam2 produeix un increment del percentatge de cèl·lules amb marcadors i factors de transcripció característics de progenitors neuronals, com són GFAP i SOX2. La sobreexpressió de Ncam2.2 produeix un major augment d'aquestes cèl·lules que la sobreexpressió de Ncam2.1. Amb aquestes dades i el fet que Ncam2.2 sigui una isoforma ancorada a membrana, ens fa plantejar la hipòtesi de que l'efecte de Ncam2 es produeixi de manera indirecta degut a una interacció heterofílica. Recentment, s'ha descrit que Ncam2 participa en la regulació de la neurogènesi en progenitors de la medul·la espinal (Deleyrolle et al., 2015). Segons aquest estudi, la sobreexpressió de Ncam2 produeix una reducció de la taxa de divisió de les neuroesferes de medul·la espinal. A més a més, es descriu que l'administració de la fracció extracel·lular de Ncam2 en el medi és suficient per produir aquest efecte. Els investigadors hipotetitzen que l'acció de Ncam2 té lloc a través de la regulació del tràfic i degradació del receptor de ErbB2. Erb2 és un receptor del factor de creixement epidèrmic involucrat en l'activació de diferents vies de senyalització en processos de migració i proliferació cel·lular (Bublil and Yarden, 2007). Per altra banda, s'ha observat la interacció de L1Cam i Ncam1 amb el receptor de FGF (FGFR). Aquesta interacció redueix la taxa de divisió dels progenitors i augmenta la diferenciació neuronal (Francavilla et al., 2009; Kulahin et al., 2008). Aquestes dades revelen que les proteïnes d'adhesió regulen la senyalització dels receptors de factors de creixements de diverses maneres. En aquest sentit, podem hipotetitzar que Ncam2 regularia a través d'unions heterofíliques la taxa de proliferació dels progenitors neuronals d'hipocamp. En aquest sentit, falten més experiments per determinar les unions que realitza Ncam2 per controlar aquest procés. La similitud estructural i les evidències experimentals fan pensar que Ncam2 en hipocamp podria controlar la via de senyalització dels receptors de factors de creixement, com FGFR o EGFR. Per les dades obtingudes en l'experiment de l'espectrometria de masses no podem descartar que interaccionin, però no tenim dades directes d'interacció.

Per determinar la funció de Ncam2 a nivell de neurogènesi, hem iniciat experiments a nivell *in vitro*. De moment, hem posat apunt la infecció de neuroesferes de progenitors de la zona subventricular i hem analitzat la taxa de divisió de línies estables que sobreexpressen Ncam2. En aquests últims experiments, hem observat que la sobreexpressió de Ncam2 produeix una reducció de la taxa de divisió de les cèl·lules 293 (**figura D.1**). La sobreexpressió tant de la isoforma Ncam2.1 com de la isoforma Ncam2.2 produeixen un retard en la taxa de divisió cel·lular. Aquests resultats corroboren la hipòtesi de que el mecanisme a través del qual actua Ncam2 és a través d'interaccions heterofíliques, ja que en les cèl·lules 293 no hi ha expressió basal de Ncam2, a diferència dels progenitors neuronals. A més a més, aquestes dades ens indiquen que és un mecanisme biològic present en diferents tipus cel·lulars. La interacció amb els receptors dels factors de creixement podria ser una causa de l'efecte observat, ja que aquests també es troben expressats en aquest tipus cel·lular.

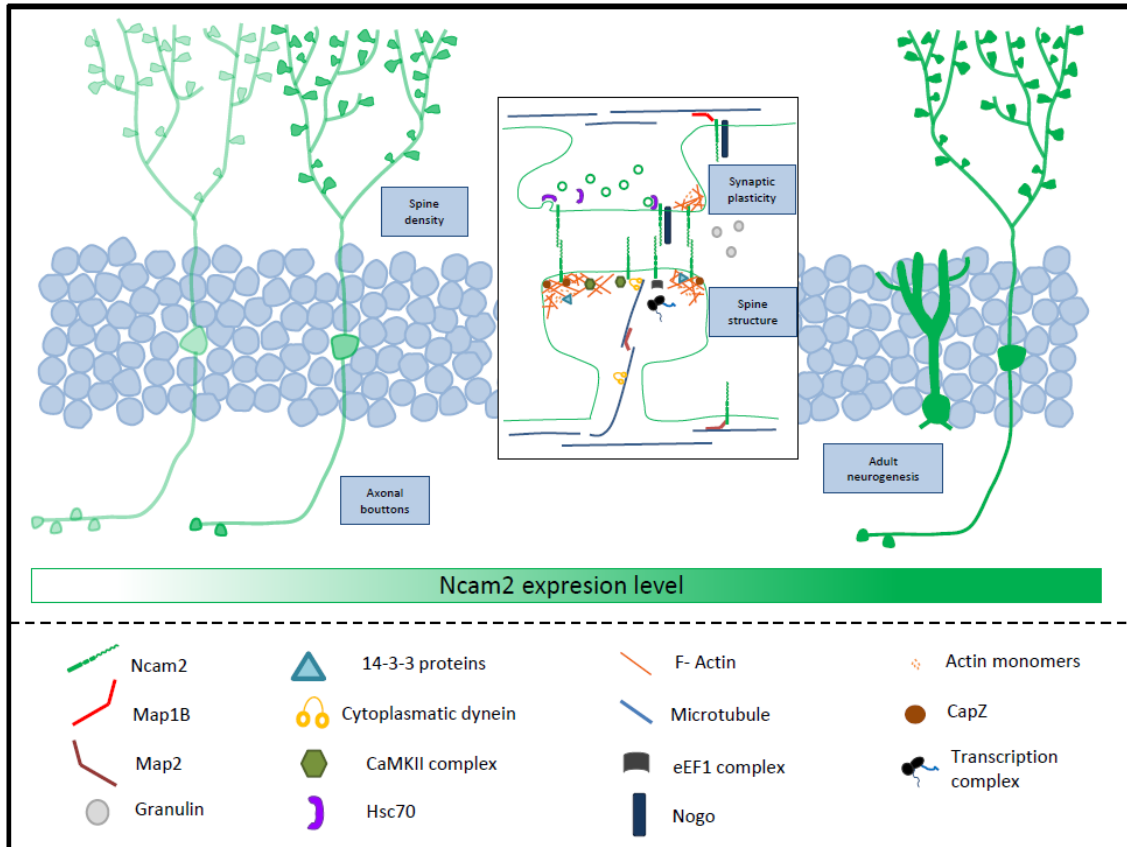
Falten més dades per comprendre el mecanisme i la funció que realitza Ncam2 a nivell de neurogènesi adulta o embrionària. En el desenvolupament, hem observat que s'expressa en els progenitors neuronals de la regió subventricular i en les neurones que migren durant la formació del còrtex. En la migració neuronal, els nivells de Ncam2 són claus per un correcte posicionament i transcripció de factors de diferenciació neuronal. En la neurogenèsi, sembla que mantenir els nivells de Ncam2 òptims evita defectes en la taxa de divisió. Tots aquests resultats fan pensar que Ncam2 és un regulador de la taxa de divisió i diferenciació cel·lular, particularment dels progenitors neuronals.



**Figura D.3. Assaig de proliferació en línees estables 293T de sobreexpressió de les isoformes Ncam2.1 i Ncam2.2.**  
 A) El gràfic mostra l'absorbància mitjana amb les mesures realitzades de forma consecutiva cada dia en l'assaig de MTT. B). El gràfic mostra els valors d'absorbància en percentatge respecte del control per cada condició experimental i lectura d'absorbància. Representades com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard; test ANOVA amb comparacions múltiples de Tuckey; \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,01$ .

### 3.3 Esquema representatiu de la funció de Ncam2 en plasticitat neuronal

Resumint, els resultats observats en el manteniment de sinapsis i la neurogenèsi adulta, i els possibles mecanismes en els quals està involucrada Ncam2 permeten proposar un model de funcionament de Ncam2 s en el següent esquema (figura D.4):



**Figura D.4. Esquema representatiu de les funcions que realitza Ncam2 en la plasticitat neuronal en adult.**

Ncam2 està involucrada en el manteniment del nombre de contactes sinàptics en cervell adult. Un dèficit en l'expressió de Ncam2 afecten el nombre d'espines dendrítiques i el nombre de botons sinàptics. Per altra banda, una sobreexpressió de Ncam2 afecta a la neurogenèsi adulta. Els nivells de Ncam2 estan representats segons la intensitat de verd.

## 4. Paper de Ncam2 *in vivo*

### 4.1 Morfogènesi neuronal *in vivo*

L'estudi dels mecanismes que regulen la polarització i desenvolupament neuronal *in vitro* han permès detectar proteïnes que tenen una implicació a nivell fisiològic, com és el cas de Map2 (Farah and Leclerc, 2008). Tanmateix, la formació del cervell *in vivo* implica diversos mecanismes i es produeix una regulació temporal i espacial del desenvolupament neuronal (Namba et al., 2015). A més a més, la complexitat dels models *in vivo* han permès demostrar l'efecte de la matriu extracel·lular i les proteïnes de membrana que hi interaccionen (Namba et al., 2015). En aquest sentit, les proteïnes d'adhesió participen en el desenvolupament neuronal a través de diferents processos, com la migració, el posicionament, la morfogènesi neuronal i la sinaptogènesi (Dalva et al., 2007; Kawauchi, 2012; Seong et al., 2015; Sytnyk et al., 2017). Hem vist que Ncam2 participa en la migració i el posicionament neuronal durant la formació del còrtex. Posteriorment, les neurones desenvolupen el seu arbre dendrític i axonal i formen les connexions. Cal destacar que l'expressió de Ncam2 *in vivo* augmenta de forma progressiva al llarg del desenvolupament i maduració neuronal. Aquest augment l'hem observat en les regions estructurades en capes i evolutivament més noves del cervell, com són les diferents zones del telencèfal: el bulb, el còrtex i l'hipocamp. El cerebel és una altra regió estructurada en capes on també s'ha observat un increment de Ncam2 durant la formació de l'arbre dendrític de les neurones Purkinje. Aquest patró d'expressió, l'estructura molecular de Ncam2 i les funcions que hem descrit *in vitro* suggeririen una funció de Ncam2 rellevant per la formació de les estructures corticals, la morfogènesi neuronal i la sinaptogènesi. Les funcions descrites en bulb i còrtex cingulat reforcen aquesta hipòtesi. En aquestes regions, la funció de Ncam2 és controlar el desenvolupament de les dendrites i els axons, la formació de les connexions i el control de la plasticitat (Ichinohe et al., 2008; Ichinohe et al., 2003; Yoshihara et al., 1997).

Tanmateix, el patró d'expressió de Ncam2 suggereix funcions diferencials al llarg del desenvolupament. En estadis inicials, la senyal de Ncam2 s'observa en les dendrites apicals, al voltant del soma i els tractes axonals. Posteriorment, la senyal es torna més puntejada, possiblement restringida en les sinapsis. *In vitro* hem determinat que Ncam2 controla la morfogènesi neuronal, tant a nivell de desenvolupament de l'arbre dendrític com del terminal axonal. A nivell neurobiològic, hi ha molts circuits neuronals on existeixen mecanismes de reconeixement molecular regulats per diferents proteïnes d'adhesió que permeten la seva formació. Aquest és el cas de la formació del circuit visual (Missaire and Hindges, 2015) o del circuit hipocampal a través de expressió diferencial de les protocadherines (Kim et al., 2010). A nivell *in vivo*, Ncam2 també podria controlar la morfogènesi neuronal i l'àrea d'influència de les dendrites, on es reben les connexions. En aquest sentit, en el còrtex cingulat la presència de Ncam2 facilita la connexió entre les neurones de la capa V i les projeccions del talem a través de l'agrupació de dendrites amb unions homofíliques (Ichinohe, 2012). El patró d'expressió de Ncam2 durant el desenvolupament en la regió del còrtex cingulat és similar a les altres regions del còrtex, l'hipocamp i el cerebel. Així doncs, l'expressió de Ncam2 ajudaria a l'agrupació d'estructures a través de les unions homofíliques, produint una fasciculació de les dendrites i axons i habilitant el desenvolupament d'aquestes estructures.

En concret, si ens fixem en l'expressió *in vivo* de Ncam2 durant el desenvolupament observem una senyal elevada a la zona de la membrana pròxima al soma i en la dendrita apical. Ncam2 a

través de la interacció amb el citoesquelet tant d'actina com de microtúbuls ajudaria a l'estructuració de les dendrites. Per altra banda, l'entrada de calci en les dendrites i el soma afavoreix la morfogènesi de les dendrites i regula l'expressió gènica, respectivament (Redmond and Ghosh, 2005; West and Greenberg, 2011). Com que s'ha descrit que l'activació de Ncam2 augmenta el calci intracel·lular (Sheng et al., 2015) i que hem observat una possible interacció de Ncam2 amb proteïnes involucrades en la regulació de calci intracel·lular i el desenvolupament neuronal, com Calumenin (Vasiljevic et al., 2012), cal plantejar la possibilitat de que Ncam2 estigui participant *in vivo* en la formació de l'arbre dendrític a través dels mecanismes discutits en l'apartat anterior i alhora pugui regular la transcripció degut a la seva localització somal.

#### **4.2 Sinaptogènesi i manteniment de les sinapsis**

Paral·lelament al desenvolupament dendrític es produeix el procés de sinaptogènesi, altament regulat per proteïnes d'adhesió, que controlen el reconeixement de les membranes i permeten la formació de les estructures sinàptiques (Waites et al., 2005). El procés d'estabilització d'aquestes estructures és dependent de la reordenació del citoesquelet i d'activitat neuronal. Ncam2 participaria en la reordenació del citoesquelet a través de la interacció directa o indirecta amb aquest. Per altra banda, hi ha moltes proteïnes d'adhesió involucrades en els processos de maduració neuronal a través de la senyal de calci (Sheng et al., 2013). En aquest sentit, Ncam2 podria participar al reconeixement molecular per facilitar la sinaptogènesi en les diferents regions i modular el flux de calci que facilitaria l'estabilització neuronal. Per altra banda, no sabem si Ncam2 és una proteïna sinaptogènica: de moment sabem que participa en la formació de l'arbre dendrític i el control de les sinapsis en adult. Falten més experiments per validar aquesta hipòtesi, però hi ha diferents indicis que indiquen una funció de Ncam2 en aquest procés de sinaptogènesi: la regulació del citoesquelet d'actina, imprescindible per la formació de l'espina; les unions homofíliques de Ncam2 que permeten el reconeixement entre diferents neurones; la interacció de Ncam2 tant en proteïnes presinàptiques com postsinàptiques, i la regulació de l'entrada de calci que controla els mecanismes de formació de sinapsis.

A nivell axonal, observem una senyal molt intensa als axons de la fímbria i del cos callós, regions per on l'hipocamp i el còrtex es connecten. Cal remarcar que, en còrtex, les neurones amb una major expressió de Ncam2 són les neurones de la capa V, que presenten projeccions corticocalloses. Els terminals axonals d'aquestes neurones pateixen un procés de maduració controlat i refinament (Kalil and Dent, 2014). Per altra banda, en cerebel també observem una elevada expressió de Ncam2 en els tractes axonals de les Purkinjes. En aquest sentit, en l'hipocamp s'observa senyal de Ncam2 en la zona del hilus i la CA3 en forma de fibres. Aquestes fibres coincideixen amb les fibres molsoses del GD. Aquestes dades d'expressió de Ncam2 reforcen la hipòtesi que Ncam2 actuaria *in vivo* també controlant el creixement axonal en escorça i hipocamp. En aquest sentit, hem vist Ncam2 *in vitro* participa en el desenvolupament de l'arbre axonal. A més a més, el nostre estudi proteòmic suggereix interacció de Ncam2 amb proteïnes rellevants en la regulació de la morfologia axonal, com els microtúbuls, els neurofilaments, Map1B o Reticulon 4.

Recapitulant, les nostres dades indiquen que Ncam2 controla la formació de les dendrites i els axons, i es coneix que es troba localitzada tant en els compartiments presinàptics com postsinàptics (Ichinohe et al., 2003). El conjunt d'evidències permeten plantejar que Ncam2 participaria en el reconeixement molecular i la formació dels compartiments sinàptics necessaris per la formació dels circuits neuronals. Aquestes funcions es podrien realitzar degut a l'acció directa o indirecta sobre el citoesquelet a través de la interacció de Ncam2 amb diferents proteïnes associades al citoesquelet d'actina i als microtúbuls. A més a més, també actuaria en la regulació de les seves dinàmiques per mitjà de diferents vies de senyalització com les de CaMKII o 14-3-3. En aquest sentit, el flux de calci a través de mecanismes activats per Ncam2 podria ser una explicació per produir l'estabilització d'aquests contactes. D'aquesta manera, la regulació de Ncam2 en les dendrites i les sinapsis condicionaria els processos d'estabilització i eliminació d'aquestes estructures durant el desenvolupament. Aquests processos es troben afectats en patologies com l'autisme i el síndrome de Down, malalties on s'ha descrit una possible implicació de Ncam2 (Makino and McLysaght, 2010; Scholz et al., 2016). En adult, Ncam2 concentrada en els contactes sinàptics participaria en processos de manteniment i plasticitat neuronal, mecanismes alterats en malalties neurodegeneratives on Ncam2 podria tenir una implicació, com per exemple la malaltia de l'Alzheimer (Han et al., 2010; Leshchyns'ka et al., 2015) o la demència frontotemporal (Filiano et al., 2013).



## 5. Mecanismes moleculars

Les molècules d'adhesió cel·lular són un conjunt de proteïnes amb un ventall d'interaccions molt ampli (Hirano and Takeichi, 2012; Morishita and Yagi, 2007; Park and Goda, 2016; Sytnyk et al., 2017). Moltes d'elles realitzen interaccions tant en la zona extracel·lular com en la intracel·lular. Aquesta característica els permet realitzar de connectors entre la matriu extracel·lular i el citosol, adaptant la neurona a les senyals externes. D'aquesta manera, aquestes proteïnes participen en molts processos durant el desenvolupament i el manteniment neuronal.

En el cas de Ncam2, hem realitzat l'estudi de l'interactoma per determinar les proteïnes amb les quals interacciona, cosa que ha permès començar a entendre els processos i vies de senyalització en els que participa. Hem de tenir present que els resultats de l'experiment d'espectrometria de masses són com "realitzar una fotografia en un moment determinat del cervell". Les mostres que hem utilitzat provenen de dos cervells de ratolins mascles de 15 dies d'edat. Per tant, tenim una llista de proteïnes que interaccionen amb Ncam2 en aquest moment precís del desenvolupament neuronal, en el qual hi ha una elevada remodelació dendrítica i plasticitat sinàptica per formar i estabilitzar els circuits neuronals. Aquest és un dels motius pels quals es va escollir aquesta edat, ja que ens interessava determinar els mecanismes involucrats en el creixement dendrític, el refinament axonal i la sinaptogènesi.

### 5.1 Localització cel·lular

Ncam2 presenta una localització cel·lular diferent segons l'estadi de maduració de la neurona. Durant el desenvolupament es localitzaria en dendrites i soma, i en cervell adult en contactes sinàptics. Aquesta localització diferencial també donaria lloc a un patró de senyalització diferencial. En aquest sentit, les proteïnes L1cam i Ncam1 presenten senyalitzacions diferencials dependents de la localització. La senyalització que produeixen depèn de la seva presència o no en els dominis rics de lípids, com els *lipids rafts* (Maness and Schachner, 2007). La localització diferencial de Ncam2 es donaria o per les modificacions postraduccionals com la palmitoilació (Kulahin and Walmod, 2010), o per la formació d'heterodímers entre les dues isoformes de Ncam2: Ncam2.1 i Ncam2.2. La isoforma Ncam2.2 presenta una unió a membrana a través de GPI. El glicosilfosfatidilinositol es troba enriquit als dominis lipídics. Tant la palmitoilació com la formació d'heterodímers podrien produir un increment de Ncam2.1 a les zones riques de lípids. Així mateix, el grau de palmitoilació podria canviar al llarg del temps. Durant el desenvolupament, Ncam2.1 presentaria menys modificacions i una localització més dispersa, al llarg de la maduració del cervell s'incrementaria el nombre de les palmitoilacions, produint una acumulació de Ncam2.1 en regions lipídiques. En aquest sentit, Ncam1 presenta també diferents nivells de polisialització al llarg de la formació del cervell. Els canvis en aquest nivell afecten a les interaccions de Ncam1, ja que aquesta és dependent del grau de polisialització (Angata et al., 2007). De la mateixa manera, les modificacions postraduccionals i les localitzacions diferencials farien que Ncam2 activés vies de senyalitzacions diferents al llarg del desenvolupament. En aquestes condicions, hem pogut observar que Ncam2 interacciona amb proteïnes involucrades en diferents mecanismes moleculars englobats en les dinàmiques del citoesquelet d'actina i microtúbuls, la senyalització de calci intracel·lular, i la transcripció específica en espines. A més a més, Ncam2 també podria actuar de receptor o lligant extracel·lular.

Conjuntament amb la localització, les interaccions detectades i les funcions descrites al llarg de la tesi, podem hipotetitzar els mecanismes i processos on intervé Ncam2. Durant el desenvolupament participaria en la neurogenèsi, la migració i la diferenciació neuronal. En la neurogènesi Ncam2 podria controlar la senyalització de factors de transcripció a través de la regulació del tràfic vesicular d'aquests receptors. Aquesta funció podria ser deguda a la interacció amb la xaperona Hsc70, necessària pel reciclatge vesicular (Mayer and Bukau, 2005). En la migració, Ncam2 modularia la dinàmica de microtúbuls a través de Map1B i la regulació de la funció del complex LIS/NDEL per mitjà de les proteïna 14-3-3 i les dineïnes. En la diferenciació neuronal, Ncam2 també podria controlar l'expressió de factors de transcripció necessaris pel desenvolupament de l'estructura dendrítica i axonal, com Cux-1, Ctip2 i Satb2 (Chen et al., 2008; Cubelos et al., 2015).

### **5.2 Desenvolupament i manteniment de l'estructura neuronal**

Durant els processos d'arborització dendrítica i formació del terminal axonal Ncam2 participa en diferents mecanismes: dinàmiques del con de creixement, l'estabilització i l'elongació de les dendrites i dels axons.

En el con de creixement, Ncam2 controla les dinàmiques del citoesquelet tant d'actina, com de microtúbuls, que permeten el moviment del con de creixement. A nivell de citoesquelet d'actina, Ncam2 ajudaria a la formació de les estructures riques amb actina com els lamel·lipodis i fil·lopodis, a través de la interacció directa amb actina i amb les proteïnes CapZ i cofilina. La regulació de cofilina es produiria a través de 14-3-3 (Bamburg, 1999). També en el con de creixement, Ncam2 ajudaria a l'estabilització del citoesquelet de microtúbuls, que permet l'elongació de les dendrites i l'axó. En aquest sentit i a nivell dendrític, interaccionaria amb Map2 i les dineïnes. La unió amb Map2 permet l'estabilització del con de creixement i l'elongació dendrítica, ja que Map2 controla l'estabilització del citoesquelet de microtúbuls i actua de connector entre aquest citoesquelet i el d'actina (Farah and Leclerc, 2008). Per altra banda, les dineïnes són necessàries pel transport i l'ancoratge del citoesquelet de microtúbuls en la membrana.

A nivell del con de creixement axonal, la interacció de Ncam2 amb Map1B podria conduir a estabilitzar el con de creixement i l'elongació. Aquest és un mecanisme paral·lel a Map2 en el compartiment axonal. D'aquesta manera, Map1B controla l'estabilitat dels microtúbuls i realitza de connector amb el citoesquelet de microtúbuls i d'actina.

A nivell de morfogènesi dendrítica, les interaccions de Ncam2 amb Map2 i el citoesquelet d'actina podrien ser punts clau, ja que podrien contribuir a estabilitzar la formació de les dendrites i a evitar els processos de retracció i desdiferenciació (Bradke and Dotti, 2000). A més a més Ncam2 podria controlar la transcripció de Map2, produint un augment de la proteïna i creant un bucle positiu per la diferenciació i formació de l'estructura neuronal. Cal remarcar en aquest context la interacció de Ncam2 amb proteïnes que controlen la senyal de calci, com CaMKII i Calumenin. CaMKII és una cinasa que activa múltiples vies de senyalització, permetent el creixement dendrític i la transcripció de factors de transcripció necessaris per la diferenciació neuronal. Per altra banda, Ncam2 podria actuar de receptor de Granulin, proteïna extracel·lular que modifica involucrada en el creixement dendrític (Gass et al., 2012). A nivell de morfogènesi axonal, Ncam2 controlaria la ramificació a través de l'estabilització dels microtúbuls, mecanisme que incrementaria l'acetilació d'aquests.

En el desenvolupament i la maduració del sistema nerviós, Ncam2 participaria en el reconeixement molecular que permet la formació de contactes entre terminals axonals i dendrítics donant lloc a la formació de sinapsis i circuits neuronals. En aquest sentit, hi ha diferents hipòtesis que relacionen les molècules d'adhesió amb una identitat molecular específica de cada neurona (Baier, 2013; Missaire and Hindges, 2015). De manera que l'expressió de diferents tipus de molècules d'adhesió cel·lular donen lloc a una identitat molecular concreta a cada neurona que permet el reconeixement específic de les projeccions que rep i realitza. En aquest sentit, Ncam2 està present en els terminals axonals i dendrítics i realitza unions homofíliques. Amb aquestes unions i les interaccions intracel·lulars de Ncam2 podem hipotetitzar que Ncam2 podria produir la modificació del citoesquelet d'actina i afectar l'estructuració de l'espina dendrítica i l'estabilització de l'espina a través de tres mecanismes: la senyal de calci, l'estructuració del citoesquelet d'actina i la interacció del citoesquelet de microtúbuls. La interacció del citoesquelet de microtúbuls es pot produir a través de la interacció amb les dineïnes i Map2. En aquest sentit, s'ha demostrat que la unió de Ncam1 amb les dineïnes al terminal postsinàptic produeix l'estabilització de la dendrita (Perlson et al., 2013).

A nivell axonal, Ncam2 participaria en la formació del botó presinàptic a través de l'organització del citoesquelet d'actina i el control de l'alliberament i reciclatge de les vesícules de neurotransmissors, degut a la interacció amb Hsc70 (Mayer and Bukau, 2005).

En cervell adult, Ncam2 estaria present en els contactes sinàptics, on participaria en processos de plasticitat degut a les diferents interaccions en el terminal presinàptic i postsinàptic. La quantitat de Ncam2 a membrana podria regular la potenciació o depressió dels processos de plasticitat. En aquest sentit, s'ha observat que la quantitat de molècules d'adhesió presents a la membranes presinàptiques i postsinàptiques regulen la plasticitat neuronal, com les neurexins i les neuroligins (Krueger et al., 2012) o les cadherines (Hirano and Takeichi, 2012). Cal destacar la interacció de Ncam2 amb diferents complexos de transcripció. D'aquesta manera, Ncam2 estaria controlant la transcripció específica de proteïna en sinapsis, mecanisme necessari per a la seva remodelació. D'altra banda, Ncam2 participaria com a receptor de granulin i Nogo en el control de la densitat i estructura sinàptica.

A nivell de patologies, Ncam2 participa en mecanismes que es veuen alterats en patologies neurodegeneratives, com la malaltia de l'Alzheimer, l'autisme o l'esquizofrènia. Aquestes malalties no presenten un factor genètic clar. S'han fet molts estudis i hipotetitzat sobre diferents gens involucrats en aquestes patologies, però només entre un 1 i un 5% tenen un origen genètic definit, com és el cas dels polimorfismes en les Presenilines en la malaltia de l'Alzheimer de tipus familiar (Dorszewska et al., 2016). Altrament, Ncam2 podria participar en les patologies neuronals de forma trans-heterozigota. La trans-heterozigosi és un mecanisme que genera disfuncions degut a alteracions en heterozigosi a més d'un gen que per separat no produeixen cap canvi (Jan and Jan, 2010). Aquest mecanisme s'ha demostrat en disfuncions del pàncrees (Rosendahl et al., 2013). D'aquesta manera, la trans-heterozigosi també en les molècules d'adhesió estaria implicada en un ampli ventall de patologies neuronals, com per exemple l'esquizofrènia, la malaltia de l'Alzheimer o l'autisme.

### 5.3 Esquema global de les funcions de Ncam2 al cervell

Al llarg de la tesi hem posat de manifest diferents funcions que realitza Ncam2 en el cervell. Partint d'aquestes dades, podem proposar un model que engloba les diverses funcions que realitza Ncam2 al cervell, així com les patologies en les quals podria estar involucrada (**figura D.5**). En cap sentit les interaccions i funcions descrites semblen exclusives de Ncam2, sinó que són processos en que es produeix un solapament funcional de moltes proteïnes d'adhesió, fet que confereix robustesa als processos de formació, manteniment i remodelació de les estructures neuronals. En concret, Ncam2 formaria part del conjunt de molècules que permeten la identitat molecular de les neurones, procés clau perquè permet la formació i el manteniment de circuits neuronals específics.

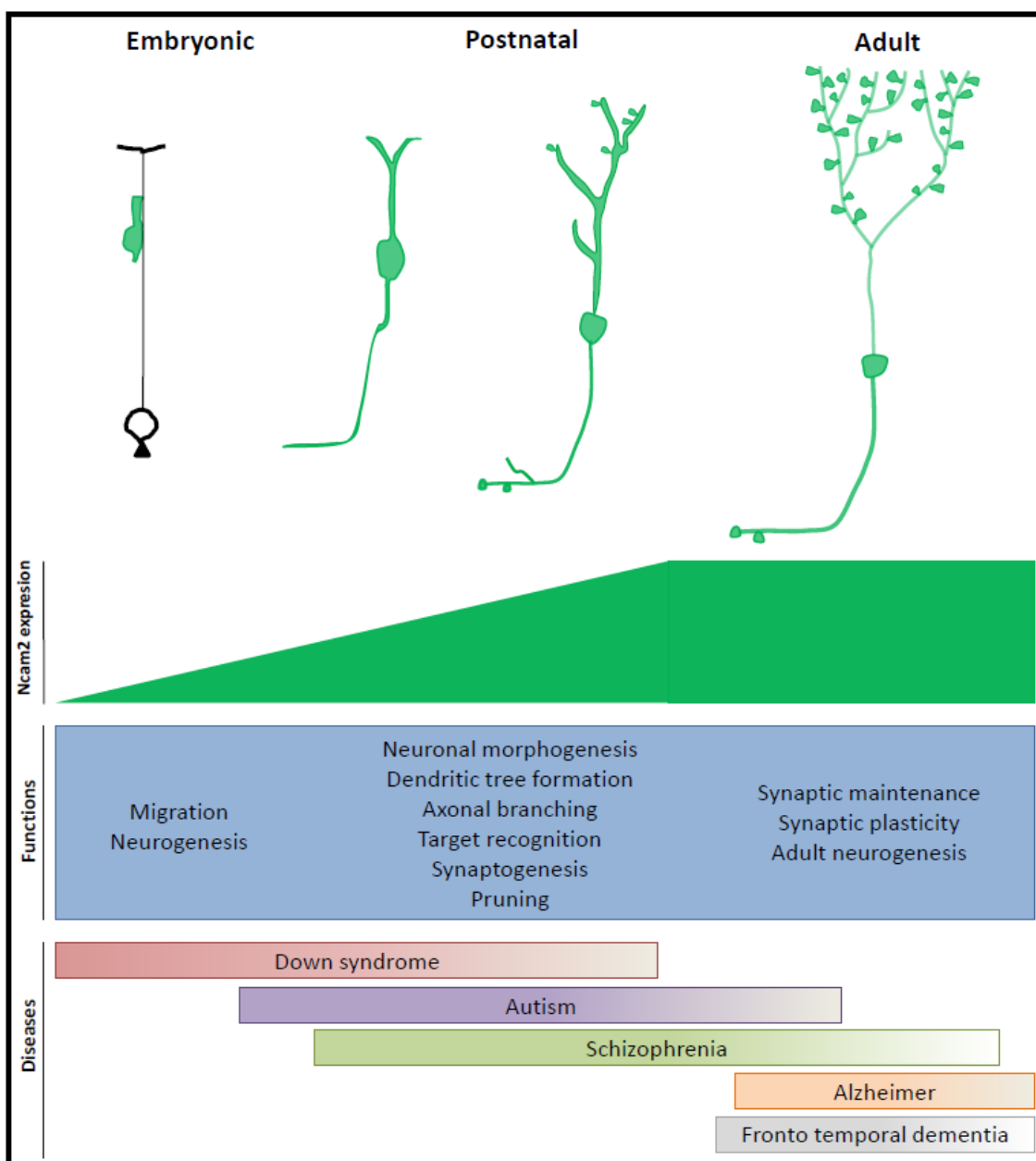


Figura D.5. Esquema global de les funcions de Ncam2.

L'expressió de Ncam2 augmenta al llarg del temps i participa en diferents funcions en desenvolupament i cervell adult. La funció de Ncam2 i la modulació de la seva expressió podrien estar involucrades en diferents patologies neuronals.



# Conclusions



1. Ncam2 s'expressa en el telencèfal des del desenvolupament primerenc i fins a l'edat adulta de forma no homogènia. La isoforma Ncam2.1 és la més abundant.
2. La localització cel·lular de Ncam2 canvia al llarg de la maduració neuronal. En el desenvolupament és localitza al voltant del soma i les dendrites i en adult es localitza amb un patró puntejat compatible amb les sinapsis.
3. Els nivells d'expressió de Ncam2 a les neurones durant el desenvolupament del còrtex són importants per garantir un posicionament neuronal correcte en la migració radial embrionària i evitar errors durant els processos de migració.
4. Ncam2 és essencial per la correcta polarització neuronal, la formació del con de creixement i el desenvolupament de l'arbre dendrític i axonal.
5. El dèficit de Ncam2 durant el desenvolupament neuronal desregula les dinàmiques dels citoesquelets d'actina i microtúbuls.
6. Ncam2.1 col·localitza amb actina i Map2 en cultius neuronals. El dèficit de Ncam2 produeix una disminució de Map2 i de tubulina acetilada.
7. La isoforma transmembrana Ncam2.1 és imprescindible pel desenvolupament de l'arbre dendrític.
8. En l'hipocamp adult Ncam2 participa en l'estabilitat sinàptica de les neurones piramidals de CA1 i granulars de gir dentat regulant-ne el nombre d'espines. Ncam2 també regula els botons sinàptics de les fibres molsoses en l'hilus.
9. Ncam2 modula la neurogènesi adulta a la regió subgranular d'hipocamp. La sobreexpressió de Ncam2 en neurones granulars produeix canvis en el desenvolupament de les neurones amb arrest de cèl·lules en l'estadi de progenitors neuronals.
10. L'estudi de l'interectoma de Ncam2 revela que interacciona amb proteïnes que poden modular la morfologia neuronal a través del citoesquelet, la senyalització de calci, la transcripció i el tràfic vesicular.





# **Bibliografia**



- Abbott, C.M., H.J. Newbery, C.E. Squires, D. Brownstein, L.A. Griffiths, and D.C. Soares. 2009. eEF1A2 and neuronal degeneration. *Biochemical Society transactions*. 37:1293-1297.
- Agarwal-Mawal, A., H.Y. Qureshi, P.W. Cafferty, Z. Yuan, D. Han, R. Lin, and H.K. Paudel. 2003. 14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex. *The Journal of biological chemistry*. 278:12722-12728.
- Aimone, J.B., Y. Li, S.W. Lee, G.D. Clemenson, W. Deng, and F.H. Gage. 2014. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological reviews*. 94:991-1026.
- Akbik, F.V., S.M. Bhagat, P.R. Patel, W.B. Cafferty, and S.M. Strittmatter. 2013. Anatomical plasticity of adult brain is titrated by Nogo Receptor 1. *Neuron*. 77:859-866.
- Al-Bassam, J., R.S. Ozer, D. Safer, S. Halpain, and R.A. Milligan. 2002. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *The Journal of cell biology*. 157:1187-1196.
- Alcamo, E.A., L. Chirivella, M. Dautzenberg, G. Dobрева, I. Farinas, R. Grosschedl, and S.K. McConnell. 2008. Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron*. 57:364-377.
- Alcantara, S., M. Ruiz, G. D'Arcangelo, F. Ezan, L. de Lecea, T. Curran, C. Sotelo, and E. Soriano. 1998. Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18:7779-7799.
- Alenius, M., and S. Bohm. 1997. Identification of a novel neural cell adhesion molecule-related gene with a potential role in selective axonal projection. *The Journal of biological chemistry*. 272:26083-26086.
- Altman, J., and G.D. Das. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*. 124:319-335.
- Amoureux, M.C., B.A. Cunningham, G.M. Edelman, and K.L. Crossin. 2000. N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 20:3631-3640.
- Andreyeva, A., I. Leshchyn'ska, M. Knepper, C. Betzel, L. Redecke, V. Sytnyk, and M. Schachner. 2010. CHL1 is a selective organizer of the presynaptic machinery chaperoning the SNARE complex. *PLoS one*. 5:e12018.
- Angata, K., V. Huckaby, B. Ranscht, A. Terskikh, J.D. Marth, and M. Fukuda. 2007. Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors are essential for mouse brain development. *Molecular and cellular biology*. 27:6659-6668.
- Arimura, N., and K. Kaibuchi. 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience*. 8:194-205.
- Baier, H. 2013. Synaptic laminae in the visual system: molecular mechanisms forming layers of perception. *Annual review of cell and developmental biology*. 29:385-416.
- Baig, D.N., T. Yanagawa, and K. Tabuchi. 2017. Distortion of the normal function of synaptic cell adhesion molecules by genetic variants as a risk for autism spectrum disorders. *Brain research bulletin*. 129:82-90.
- Bajor, M., and L. Kaczmarek. 2013. Proteolytic remodeling of the synaptic cell adhesion molecules (CAMs) by metzincins in synaptic plasticity. *Neurochemical research*. 38:1113-1121.
- Bamburg, J.R. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*. 15:185-230.
- Barnes, A.P., and F. Polleux. 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annual review of neuroscience*. 32:347-381.
- Barry, D.S., J.M. Pakan, and K.W. McDermott. 2014. Radial glial cells: key organisers in CNS development. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 46:76-79.
- Barry, G., M. Piper, C. Lindwall, R. Moldrich, S. Mason, E. Little, A. Sarkar, S. Tole, R.M. Gronostajski, and L.J. Richards. 2008. Specific glial populations regulate hippocampal morphogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:12328-12340.
- Bateman, A., and H.P. Bennett. 1998. Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *The Journal of endocrinology*. 158:145-151.
- Becker, L.E., D.L. Armstrong, and F. Chan. 1986. Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Annals of neurology*. 20:520-526.

- Beckervordersandforth, R., C.L. Zhang, and D.C. Lie. 2015. Transcription-Factor-Dependent Control of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 7:a018879.
- Benner, E.J., D. Luciano, R. Jo, K. Abdi, P. Paez-Gonzalez, H. Sheng, D.S. Warner, C. Liu, C. Eroglu, and C.T. Kuo. 2013. Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature*. 497:369-373.
- Bentley, M., and G. Banker. 2016. The cellular mechanisms that maintain neuronal polarity. *Nature reviews. Neuroscience*. 17:611-622.
- Berg, D., C. Holzmann, and O. Riess. 2003. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*. 4:752-762.
- Bergmann, O., K.L. Spalding, and J. Frisen. 2015. Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 7:a018994.
- Bodrikov, V., V. Sytnyk, I. Leshchyn'ska, J. den Hertog, and M. Schachner. 2008. NCAM induces CaMKIIalpha-mediated RPTalpha phosphorylation to enhance its catalytic activity and neurite outgrowth. *The Journal of cell biology*. 182:1185-1200.
- Borisovska, M., M.J. McGinley, A. Bensen, and G.L. Westbrook. 2011. Loss of olfactory cell adhesion molecule reduces the synchrony of mitral cell activity in olfactory glomeruli. *The Journal of physiology*. 589:1927-1941.
- Boutin, C., A.M. Goffinet, and F. Tissir. 2012. Celsr1-3 cadherins in PCP and brain development. *Current topics in developmental biology*. 101:161-183.
- Bradke, F., and C.G. Dotti. 2000. Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Current biology : CB*. 10:1467-1470.
- Bublil, E.M., and Y. Yarden. 2007. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Current opinion in cell biology*. 19:124-134.
- Buttner, B., C. Kannicht, W. Reutter, and R. Horstkorte. 2003. The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. *Biochemical and biophysical research communications*. 310:967-971.
- Caceres, A., J. Mautino, and K.S. Kosik. 1992. Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron*. 9:607-618.
- Caceres, A., M.R. Payne, L.I. Binder, and O. Steward. 1983. Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80:1738-1742.
- Cao, Y., M. Portela, J. Janikiewicz, J. Doig, and C.M. Abbott. 2014. Characterisation of translation elongation factor eEF1B subunit expression in mammalian cells and tissues and co-localisation with eEF1A2. *PLoS one*. 9:e114117.
- Cardoso, C., R.J. Leventer, H.L. Ward, K. Toyo-Oka, J. Chung, A. Gross, C.L. Martin, J. Allanson, D.T. Pilz, A.H. Olney, O.M. Mutchinick, S. Hirotsune, A. Wynshaw-Boris, W.B. Dobyns, and D.H. Ledbetter. 2003. Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *American journal of human genetics*. 72:918-930.
- Carter, M.D., C.R. Shah, C.L. Muller, J.N. Crawley, A.M. Carneiro, and J. Veenstra-VanderWeele. 2011. Absence of preference for social novelty and increased grooming in integrin beta3 knockout mice: initial studies and future directions. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*. 4:57-67.
- Castillo, P.E. 2012. Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 4.
- Castillo, P.E., C.Q. Chiu, and R.C. Carroll. 2011. Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Current opinion in neurobiology*. 21:328-338.
- Castillo, P.E., S. Schoch, F. Schmitz, T.C. Sudhof, and R.C. Malenka. 2002. RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature*. 415:327-330.
- Chai, X., and M. Frotscher. 2016. How does Reelin signaling regulate the neuronal cytoskeleton during migration? *Neurogenesis*. 3:e1242455.
- Chen, B., S.S. Wang, A.M. Hattox, H. Rayburn, S.B. Nelson, and S.K. McConnell. 2008. The Fezf2-Ctip2 genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:11382-11387.
- Chen, W.V., and T. Maniatis. 2013. Clustered protocadherins. *Development*. 140:3297-3302.

- Cheng, P.L., and M.M. Poo. 2012. Early events in axon/dendrite polarization. *Annual review of neuroscience*. 35:181-201.
- Cho, S.J., J.S. Jung, B.H. Ko, I. Jin, and I.S. Moon. 2004. Presence of translation elongation factor-1A (eEF1A) in the excitatory postsynaptic density of rat cerebral cortex. *Neuroscience letters*. 366:29-33.
- Colgan, L.A., and R. Yasuda. 2014. Plasticity of dendritic spines: subcompartmentalization of signaling. *Annual review of physiology*. 76:365-385.
- Collingridge, G.L., S. Peineau, J.G. Howland, and Y.T. Wang. 2010. Long-term depression in the CNS. *Nature reviews. Neuroscience*. 11:459-473.
- Collins, M.O., H. Husi, L. Yu, J.M. Brandon, C.N. Anderson, W.P. Blackstock, J.S. Choudhary, and S.G. Grant. 2006. Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *Journal of neurochemistry*. 97 Suppl 1:16-23.
- Conde, C., and A. Caceres. 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature reviews. Neuroscience*. 10:319-332.
- Cruts, M., I. Gijselink, J. van der Zee, S. Engelborghs, H. Wils, D. Pirici, R. Rademakers, R. Vandenberghe, B. Dermaut, J.J. Martin, C. van Duijn, K. Peeters, R. Sciot, P. Santens, T. De Pooter, M. Mattheijssens, M. Van den Broeck, I. Cuijt, K. Vennekens, P.P. De Deyn, S. Kumar-Singh, and C. Van Broeckhoven. 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 442:920-924.
- Cubelos, B., C.G. Briz, G.M. Esteban-Ortega, and M. Nieto. 2015. Cux1 and Cux2 selectively target basal and apical dendritic compartments of layer II-III cortical neurons. *Developmental neurobiology*. 75:163-172.
- Cubelos, B., A. Sebastian-Serrano, L. Beccari, M.E. Calcagnotto, E. Cisneros, S. Kim, A. Dopazo, M. Alvarez-Dolado, J.M. Redondo, P. Bovolenta, C.A. Walsh, and M. Nieto. 2010. Cux1 and Cux2 regulate dendritic branching, spine morphology, and synapses of the upper layer neurons of the cortex. *Neuron*. 66:523-535.
- da Silva, J.S., and C.G. Dotti. 2002. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neurogenesis. *Nature reviews. Neuroscience*. 3:694-704.
- Dalva, M.B., A.C. McClelland, and M.S. Kayser. 2007. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nature reviews. Neuroscience*. 8:206-220.
- Danglot, L., A. Triller, and S. Marty. 2006. The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus*. 16:1032-1060.
- Davis, D.A., M.H. Wilson, J. Giraud, Z. Xie, H.C. Tseng, C. England, H. Herscovitz, L.H. Tsai, and I. Delalle. 2009. Capzb2 interacts with beta-tubulin to regulate growth cone morphology and neurite outgrowth. *PLoS biology*. 7:e1000208.
- de la Torre-Ubieta, L., and A. Bonni. 2011. Transcriptional regulation of neuronal polarity and morphogenesis in the mammalian brain. *Neuron*. 72:22-40.
- Del Rio, J.A., B. Heimrich, V. Borrell, E. Forster, A. Drakew, S. Alcantara, K. Nakajima, T. Miyata, M. Ogawa, K. Mikoshiba, P. Derer, M. Frotscher, and E. Soriano. 1997. A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*. 385:70-74.
- Deleyrolle, L., J.C. Sabourin, B. Rothhut, H. Fujita, P.O. Guichet, M. Teigell, C. Ripoll, N. Chauvet, F. Perrin, D. Mamaeva, T. Noda, K. Mori, Y. Yoshihara, and J.P. Hugnot. 2015. OCAM regulates embryonic spinal cord stem cell proliferation by modulating ErbB2 receptor. *PLoS one*. 10:e0122337.
- Demyanenko, G.P., M. Schachner, E. Anton, R. Schmid, G. Feng, J. Sanes, and P.F. Maness. 2004. Close homolog of L1 modulates area-specific neuronal positioning and dendrite orientation in the cerebral cortex. *Neuron*. 44:423-437.
- Demyanenko, G.P., A.Y. Tsai, and P.F. Maness. 1999. Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 19:4907-4920.
- Deng, W., J.B. Aimone, and F.H. Gage. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature reviews. Neuroscience*. 11:339-350.
- Dent, E.W. 2017. Of microtubules and memory: implications for microtubule dynamics in dendrites and spines. *Molecular biology of the cell*. 28:1-8.
- Dent, E.W., S.L. Gupton, and F.B. Gertler. 2011. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3.

- Dihne, M., C. Bernreuther, M. Sibbe, W. Paulus, and M. Schachner. 2003. A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 23:6638-6650.
- Dillon, C., and Y. Goda. 2005. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annual review of neuroscience*. 28:25-55.
- Ditlevsen, D.K., and K. Kolkova. 2010. Signaling pathways involved in NCAM-induced neurite outgrowth. *Advances in experimental medicine and biology*. 663:151-168.
- Dobyns, W.B., O. Reiner, R. Carrozzo, and D.H. Ledbetter. 1993. Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *Jama*. 270:2838-2842.
- Doetsch, F., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 17:5046-5061.
- Dorszewska, J., M. Predecki, A. Oczkowska, M. Dezor, and W. Kozubski. 2016. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*. 13:952-963.
- Edwards, M., A. Zwolak, D.A. Schafer, D. Sept, R. Dominguez, and J.A. Cooper. 2014. Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15:677-689.
- Evsyukova, I., C. Plestant, and E.S. Anton. 2013. Integrative mechanisms of oriented neuronal migration in the developing brain. *Annual review of cell and developmental biology*. 29:299-353.
- Fan, Y., X. Tang, E. Vitriol, G. Chen, and J.Q. Zheng. 2011. Actin capping protein is required for dendritic spine development and synapse formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:10228-10233.
- Farah, C.A., and N. Leclerc. 2008. HMWMAP2: new perspectives on a pathway to dendritic identity. *Cell motility and the cytoskeleton*. 65:515-527.
- Filiano, A.J., L.H. Martens, A.H. Young, B.A. Warmus, P. Zhou, G. Diaz-Ramirez, J. Jiao, Z. Zhang, E.J. Huang, F.B. Gao, R.V. Farese, Jr., and E.D. Roberson. 2013. Dissociation of frontotemporal dementia-related deficits and neuroinflammation in progranulin haploinsufficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 33:5352-5361.
- Fink, C.C., K.U. Bayer, J.W. Myers, J.E. Ferrell, Jr., H. Schulman, and T. Meyer. 2003. Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron*. 39:283-297.
- Fontaine, S.N., M.D. Martin, E. Akoury, V.A. Assimon, S. Borysov, B.A. Nordhues, J.J. Sabbagh, M. Cockman, J.E. Gestwicki, M. Zweckstetter, and C.A. Dickey. 2015. The active Hsc70/tau complex can be exploited to enhance tau turnover without damaging microtubule dynamics. *Human molecular genetics*. 24:3971-3981.
- Foote, M., H. Qiao, K. Graham, Y. Wu, and Y. Zhou. 2015. Inhibition of 14-3-3 Proteins Leads to Schizophrenia-Related Behavioral Phenotypes and Synaptic Defects in Mice. *Biological psychiatry*. 78:386-395.
- Forster, E., S. Zhao, and M. Frotscher. 2006. Laminating the hippocampus. *Nature reviews. Neuroscience*. 7:259-267.
- Francavilla, C., P. Cattaneo, V. Berezin, E. Bock, D. Ami, A. de Marco, G. Christofori, and U. Cavallaro. 2009. The binding of NCAM to FGFR1 induces a specific cellular response mediated by receptor trafficking. *The Journal of cell biology*. 187:1101-1116.
- Frei, J.A., and E.T. Stoekli. 2016. SynCAMs - From axon guidance to neurodevelopmental disorders. *Molecular and cellular neurosciences*.
- Funahashi, Y., T. Namba, S. Nakamuta, and K. Kaibuchi. 2014. Neuronal polarization in vivo: Growing in a complex environment. *Current opinion in neurobiology*. 27:215-223.
- Gambello, M.J., D.L. Darling, J. Yingling, T. Tanaka, J.G. Gleeson, and A. Wynshaw-Boris. 2003. Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 23:1719-1729.
- Garcia-Verdugo, J.M., F. Doetsch, H. Wichterle, D.A. Lim, and A. Alvarez-Buylla. 1998. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *Journal of neurobiology*. 36:234-248.

- Garnham, C.P., and A. Roll-Mecak. 2012. The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton*. 69:442-463.
- Gass, J., W.C. Lee, C. Cook, N. Finch, C. Stetler, K. Jansen-West, J. Lewis, C.D. Link, R. Rademakers, A. Nykjaer, and L. Petrucelli. 2012. Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin. *Molecular neurodegeneration*. 7:33.
- Ge, S., E.L. Goh, K.A. Sailor, Y. Kitabatake, G.L. Ming, and H. Song. 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*. 439:589-593.
- Georg Kuhn, H., and K. Blomgren. 2011. Developmental dysregulation of adult neurogenesis. *The European journal of neuroscience*. 33:1115-1122.
- Gonzalez-Billault, C., J.A. Del Rio, J.M. Urena, E.M. Jimenez-Mateos, M.J. Barallobre, M. Pascual, L. Pujadas, S. Simo, A.L. Torre, R. Gavin, F. Wandosell, E. Soriano, and J. Avila. 2005. A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration. *Cerebral cortex*. 15:1134-1145.
- Gould, E. 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature reviews. Neuroscience*. 8:481-488.
- Gray, E.G. 1963. Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *Journal of anatomy*. 97:101-106.
- Greene, N.D., and A.J. Copp. 2014. Neural tube defects. *Annual review of neuroscience*. 37:221-242.
- Greig, L.C., M.B. Woodworth, M.J. Galazo, H. Padmanabhan, and J.D. Macklis. 2013. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature reviews. Neuroscience*. 14:755-769.
- Haas, K.F., and K. Broadie. 2008. Roles of ubiquitination at the synapse. *Biochimica et biophysica acta*. 1779:495-506.
- Haldeman-Englert, C.R., K.A. Chapman, H. Kruger, E.A. Geiger, D.M. McDonald-McGinn, E. Rappaport, E.H. Zackai, N.B. Spinner, and T.H. Shaikh. 2010. A de novo 8.8-Mb deletion of 21q21.1-q21.3 in an autistic male with a complex rearrangement involving chromosomes 6, 10, and 21. *American journal of medical genetics. Part A*. 152A:196-202.
- Hall, A.C., F.R. Lucas, and P.C. Salinas. 2000. Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell*. 100:525-535.
- Halpain, S., and L. Dehmelt. 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome biology*. 7:224.
- Hamlin, J.A., H. Fang, and J.E. Schwob. 2004. Differential expression of the mammalian homologue of fasciclin II during olfactory development in vivo and in vitro. *The Journal of comparative neurology*. 474:438-452.
- Han, M.R., G.D. Schellenberg, L.S. Wang, and I. Alzheimer's Disease Neuroimaging. 2010. Genome-wide association reveals genetic effects on human Abeta42 and tau protein levels in cerebrospinal fluids: a case control study. *BMC neurology*. 10:90.
- Hansen, S.M., V. Berezin, and E. Bock. 2008. Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 65:3809-3821.
- Harada, A., J. Teng, Y. Takei, K. Oguchi, and N. Hirokawa. 2002. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *The Journal of cell biology*. 158:541-549.
- Hell, J.W. 2014. CaMKII: claiming center stage in postsynaptic function and organization. *Neuron*. 81:249-265.
- Hinsby, A.M., V. Berezin, and E. Bock. 2004. Molecular mechanisms of NCAM function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 9:2227-2244.
- Hippenmeyer, S. 2014. Molecular pathways controlling the sequential steps of cortical projection neuron migration. *Advances in experimental medicine and biology*. 800:1-24.
- Hippenmeyer, S., Y.H. Youn, H.M. Moon, K. Miyamichi, H. Zong, A. Wynshaw-Boris, and L. Luo. 2010. Genetic mosaic dissection of Lis1 and Ndel1 in neuronal migration. *Neuron*. 68:695-709.
- Hirano, S., and M. Takeichi. 2012. Cadherins in brain morphogenesis and wiring. *Physiological reviews*. 92:597-634.
- Hodge, R.D., B.R. Nelson, R.J. Kahoud, R. Yang, K.E. Mussar, S.L. Reiner, and R.F. Hevner. 2012. Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 32:6275-6287.



- Hoerndli, F.J., M. Walser, E. Frohli Hoier, D. de Quervain, A. Papassotiropoulos, and A. Hajnal. 2009. A conserved function of *C. elegans* CASY-1 calyntenin in associative learning. *PLoS one*. 4:e4880.
- Homma, N., Y. Takei, Y. Tanaka, T. Nakata, S. Terada, M. Kikkawa, Y. Noda, and N. Hirokawa. 2003. Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell*. 114:229-239.
- Hotulainen, P., and C.C. Hoogenraad. 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of cell biology*. 189:619-629.
- Huberman, A.D., T.R. Clandinin, and H. Baier. 2010. Molecular and cellular mechanisms of lamina-specific axon targeting. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a001743.
- Huttlin, E.L., M.P. Jedrychowski, J.E. Elias, T. Goswami, R. Rad, S.A. Beausoleil, J. Villen, W. Haas, M.E. Sowa, and S.P. Gygi. 2010. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*. 143:1174-1189.
- Ichinohe, N. 2012. Small-scale module of the rat granular retrosplenial cortex: an example of the minicolumn-like structure of the cerebral cortex. *Frontiers in neuroanatomy*. 5:69.
- Ichinohe, N., A. Knight, M. Ogawa, T. Ohshima, K. Mikoshiba, Y. Yoshihara, T. Terashima, and K.S. Rockland. 2008. Unusual patch-matrix organization in the retrosplenial cortex of the reeler mouse and Shaking rat Kawasaki. *Cerebral cortex*. 18:1125-1138.
- Ichinohe, N., Y. Yoshihara, T. Hashikawa, and K.S. Rockland. 2003. Developmental study of dendritic bundles in layer 1 of the rat granular retrosplenial cortex with special reference to a cell adhesion molecule, OCAM. *The European journal of neuroscience*. 18:1764-1774.
- Ikeda, M., T. Hikita, S. Taya, J. Uruguchi-Asaki, K. Toyo-oka, A. Wynshaw-Boris, H. Ujike, T. Inada, K. Takao, T. Miyakawa, N. Ozaki, K. Kaibuchi, and N. Iwata. 2008. Identification of YWHAE, a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Human molecular genetics*. 17:3212-3222.
- Jacovina, A.T., F. Zhong, E. Khazanova, E. Lev, A.B. Deora, and K.A. Hajjar. 2001. Neuritegenesis and the nerve growth factor-induced differentiation of PC-12 cells requires annexin II-mediated plasmin generation. *The Journal of biological chemistry*. 276:49350-49358.
- Jan, Y.N., and L.Y. Jan. 2010. Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nature reviews. Neuroscience*. 11:316-328.
- Jansen, S., K. Melkova, Z. Trosanova, K. Hanakova, M. Zachrdla, J. Novacek, E. Zupa, Z. Zdrahal, J. Hritz, and L. Zidek. 2017. Quantitative mapping of microtubule-associated protein 2c (MAP2c) phosphorylation and regulatory protein 14-3-3zeta-binding sites reveals key differences between MAP2c and its homolog Tau. *The Journal of biological chemistry*. 292:6715-6727.
- Jeanneteau, F., K. Deinhardt, G. Miyoshi, A.M. Bennett, and M.V. Chao. 2010. The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching. *Nature neuroscience*. 13:1373-1379.
- Jebelli, J., W. Su, S. Hopkins, J. Pocock, and G.A. Garden. 2015. Glia: guardians, gluttons, or guides for the maintenance of neuronal connectivity? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1351:1-10.
- Jossin, Y., and J.A. Cooper. 2011. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nature neuroscience*. 14:697-703.
- Kalil, K., and E.W. Dent. 2014. Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS. *Nature reviews. Neuroscience*. 15:7-18.
- Kasahara, K., K. Watanabe, Y. Kozutsumi, A. Oohira, T. Yamamoto, and Y. Sanai. 2002. Association of GPI-anchored protein TAG-1 with src-family kinase Lyn in lipid rafts of cerebellar granule cells. *Neurochemical research*. 27:823-829.
- Kasahara, K., K. Watanabe, K. Takeuchi, H. Kaneko, A. Oohira, T. Yamamoto, and Y. Sanai. 2000. Involvement of gangliosides in glycosylphosphatidylinositol-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 signaling in lipid rafts. *The Journal of biological chemistry*. 275:34701-34709.
- Katidou, M., M. Vidaki, M. Strigini, and D. Karagogeos. 2008. The immunoglobulin superfamily of neuronal cell adhesion molecules: lessons from animal models and correlation with human disease. *Biotechnology journal*. 3:1564-1580.
- Kaufmann, W.E., S.M. MacDonald, and C.R. Altamura. 2000. Dendritic cytoskeletal protein expression in mental retardation: an immunohistochemical study of the neocortex in Rett syndrome. *Cerebral cortex*. 10:992-1004.
- Kaufmann, W.E., and H.W. Moser. 2000. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral cortex*. 10:981-991.

- Kawauchi, T. 2012. Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis. *International journal of molecular sciences*. 13:4564-4590.
- Kawauchi, T. 2015. Cellular insights into cerebral cortical development: focusing on the locomotion mode of neuronal migration. *Frontiers in cellular neuroscience*. 9:394.
- Kawauchi, T., K. Chihama, Y.V. Nishimura, Y. Nabeshima, and M. Hoshino. 2005. MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25, and JNK. *Biochemical and biophysical research communications*. 331:50-55.
- Kawauchi, T., and M. Hoshino. 2008. Molecular pathways regulating cytoskeletal organization and morphological changes in migrating neurons. *Developmental neuroscience*. 30:36-46.
- Kawauchi, T., K. Sekine, M. Shikanai, K. Chihama, K. Tomita, K. Kubo, K. Nakajima, Y. Nabeshima, and M. Hoshino. 2010. Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron*. 67:588-602.
- Kelsch, W., S. Sim, and C. Lois. 2010. Watching synaptogenesis in the adult brain. *Annual review of neuroscience*. 33:131-149.
- Kempermann, G., H. Song, and F.H. Gage. 2015. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 7:a018812.
- Kent, C.B., T. Shimada, G.B. Ferraro, B. Ritter, P.T. Yam, P.S. McPherson, F. Charron, T.E. Kennedy, and A.E. Fournier. 2010. 14-3-3 proteins regulate protein kinase a activity to modulate growth cone turning responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:14059-14067.
- Khalaf-Nazzal, R., and F. Francis. 2013. Hippocampal development - old and new findings. *Neuroscience*. 248:225-242.
- Khuchua, Z., D.F. Wozniak, M.E. Bardgett, Z. Yue, M. McDonald, J. Boero, R.E. Hartman, H. Sims, and A.W. Strauss. 2003. Deletion of the N-terminus of murine map2 by gene targeting disrupts hippocampal ca1 neuron architecture and alters contextual memory. *Neuroscience*. 119:101-111.
- Kim, S.Y., J.W. Mo, S. Han, S.Y. Choi, S.B. Han, B.H. Moon, I.J. Rhyu, W. Sun, and H. Kim. 2010. The expression of non-clustered protocadherins in adult rat hippocampal formation and the connecting brain regions. *Neuroscience*. 170:189-199.
- Kimura, R., K. Kamino, M. Yamamoto, A. Nuripa, T. Kida, H. Kazui, R. Hashimoto, T. Tanaka, T. Kudo, H. Yamagata, Y. Tabara, T. Miki, H. Akatsu, K. Kosaka, E. Funakoshi, K. Nishitomi, G. Sakaguchi, A. Kato, H. Hattori, T. Uema, and M. Takeda. 2007. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Human molecular genetics*. 16:15-23.
- Kishimoto, T., K. Itoh, M. Umekage, M. Tonosaki, T. Yaoi, K. Fukui, V.P. Lemmon, and S. Fushiki. 2013. Downregulation of L1 perturbs neuronal migration and alters the expression of transcription factors in murine neocortex. *Journal of neuroscience research*. 91:42-50.
- Kislinger, T., B. Cox, A. Kannan, C. Chung, P. Hu, A. Ignatchenko, M.S. Scott, A.O. Gramolini, Q. Morris, M.T. Hallett, J. Rossant, T.R. Hughes, B. Frey, and A. Emili. 2006. Global survey of organ and organelle protein expression in mouse: combined proteomic and transcriptomic profiling. *Cell*. 125:173-186.
- Kitanishi, T., J. Sakai, S. Kojima, Y. Saitoh, K. Inokuchi, M. Fukaya, M. Watanabe, N. Matsuki, and M.K. Yamada. 2010. Activity-dependent localization in spines of the F-actin capping protein CapZ screened in a rat model of dementia. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 15:737-747.
- Kleene, R., H. Chaudhary, N. Karl, J. Katic, A. Kotarska, K. Guitart, G. Loers, and M. Schachner. 2015. Interaction between CHL1 and serotonin receptor 2c regulates signal transduction and behavior in mice. *Journal of cell science*. 128:4642-4652.
- Kleene, R., M. Mzoughi, G. Joshi, I. Kalus, U. Bormann, C. Schulze, M.F. Xiao, A. Dityatev, and M. Schachner. 2010. NCAM-induced neurite outgrowth depends on binding of calmodulin to NCAM and on nuclear import of NCAM and fak fragments. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:10784-10798.
- Koleske, A.J. 2013. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nature reviews. Neuroscience*. 14:536-550.
- Krueger, D.D., L.P. Tuffy, T. Papadopoulos, and N. Brose. 2012. The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses. *Current opinion in neurobiology*. 22:412-422.

- Kuhn, H.G. 2015. Control of Cell Survival in Adult Mammalian Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 7.
- Kuijpers, M., and C.C. Hoogenraad. 2011. Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Molecular and cellular neurosciences*. 48:349-358.
- Kulahin, N., O. Kristensen, K.K. Rasmussen, L. Olsen, P. Rydberg, B. Vestergaard, J.S. Kastrup, V. Berezin, E. Bock, P.S. Walmod, and M. Gajhede. 2011. Structural model and trans-interaction of the entire ectodomain of the olfactory cell adhesion molecule. *Structure*. 19:203-211.
- Kulahin, N., S. Li, A. Hinsby, V. Kiselyov, V. Berezin, and E. Bock. 2008. Fibronectin type III (FN3) modules of the neuronal cell adhesion molecule L1 interact directly with the fibroblast growth factor (FGF) receptor. *Molecular and cellular neurosciences*. 37:528-536.
- Kulahin, N., and P.S. Walmod. 2010. The neural cell adhesion molecule NCAM2/OCAM/RNCAM, a close relative to NCAM. *Advances in experimental medicine and biology*. 663:403-420.
- Kulkarni, V.A., and B.L. Firestein. 2012. The dendritic tree and brain disorders. *Molecular and cellular neurosciences*. 50:10-20.
- La Torre, A., A. Hoshino, C. Cavanaugh, C.B. Ware, and T.A. Reh. 2015. The GIPC1-Akt1 Pathway Is Required for the Specification of the Eye Field in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem cells*. 33:2674-2685.
- Laplagne, D.A., M.S. Esposito, V.C. Piatti, N.A. Morgenstern, C. Zhao, H. van Praag, F.H. Gage, and A.F. Schinder. 2006. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS biology*. 4:e409.
- Lee, C.W., J. Han, J.R. Bamburg, L. Han, R. Lynn, and J.Q. Zheng. 2009. Regulation of acetylcholine receptor clustering by ADF/cofilin-directed vesicular trafficking. *Nature neuroscience*. 12:848-856.
- Lee, H., S.J. Raiker, K. Venkatesh, R. Geary, L.A. Robak, Y. Zhang, H.H. Yeh, P. Shrager, and R.J. Giger. 2008. Synaptic function for the Nogo-66 receptor NgR1: regulation of dendritic spine morphology and activity-dependent synaptic strength. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:2753-2765.
- Lee, M.K., and D.W. Cleveland. 1996. Neuronal intermediate filaments. *Annual review of neuroscience*. 19:187-217.
- Lefebvre, J.L., J.R. Sanes, and J.N. Kay. 2015. Development of dendritic form and function. *Annual review of cell and developmental biology*. 31:741-777.
- Leone, D.P., K. Srinivasan, B. Chen, E. Alcamo, and S.K. McConnell. 2008. The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Current opinion in neurobiology*. 18:28-35.
- Leshchyn'ska, I., H.T. Liew, C. Shepherd, G.M. Halliday, C.H. Stevens, Y.D. Ke, L.M. Ittner, and V. Sytnyk. 2015. Abeta-dependent reduction of NCAM2-mediated synaptic adhesion contributes to synapse loss in Alzheimer's disease. *Nature communications*. 6:8836.
- Leshchyn'ska, I., and V. Sytnyk. 2016. Synaptic Cell Adhesion Molecules in Alzheimer's Disease. *Neural plasticity*. 2016:6427537.
- Leshchyn'ska, I., V. Sytnyk, M. Richter, A. Andreyeva, D. Puchkov, and M. Schachner. 2006. The adhesion molecule CHL1 regulates uncoating of clathrin-coated synaptic vesicles. *Neuron*. 52:1011-1025.
- Lewis, T.L., Jr., J. Courchet, and F. Polleux. 2013. Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *The Journal of cell biology*. 202:837-848.
- Li, S., B. Aufiero, R.L. Schiltz, and M.J. Walsh. 2000. Regulation of the homeodomain CCAAT displacement/cut protein function by histone acetyltransferases p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor and CBP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:7166-7171.
- Lim, D.A., and A. Alvarez-Buylla. 2016. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 8.
- Liu, Z., R. Steward, and L. Luo. 2000. Drosophila Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nature cell biology*. 2:776-783.
- Makino, T., and A. McLysaght. 2010. Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:9270-9274.

- Maness, P.F., and M. Schachner. 2007. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature neuroscience*. 10:19-26.
- Marin-Burgin, A., L.A. Mongiat, M.B. Pardi, and A.F. Schinder. 2012. Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science*. 335:1238-1242.
- Marin, O., and J.L. Rubenstein. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annual review of neuroscience*. 26:441-483.
- Marin, O., M. Valiente, X. Ge, and L.H. Tsai. 2010. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a001834.
- Mayer, M.P., and B. Bukau. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 62:670-684.
- Mei, L., and W.C. Xiong. 2008. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nature reviews. Neuroscience*. 9:437-452.
- Missaire, M., and R. Hindges. 2015. The role of cell adhesion molecules in visual circuit formation: from neurite outgrowth to maps and synaptic specificity. *Developmental neurobiology*. 75:569-583.
- Mohan, R., and A. John. 2015. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB life*. 67:395-403.
- Molloy, C.A., M. Keddache, and L.J. Martin. 2005. Evidence for linkage on 21q and 7q in a subset of autism characterized by developmental regression. *Molecular psychiatry*. 10:741-746.
- Molyneaux, B.J., P. Arlotta, J.R. Menezes, and J.D. Macklis. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience*. 8:427-437.
- Morishita, H., and T. Yagi. 2007. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Current opinion in cell biology*. 19:584-592.
- Namba, T., Y. Funahashi, S. Nakamuta, C. Xu, T. Takano, and K. Kaibuchi. 2015. Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity. *Physiological reviews*. 95:995-1024.
- Namba, T., Y. Kibe, Y. Funahashi, S. Nakamuta, T. Takano, T. Ueno, A. Shimada, S. Kozawa, M. Okamoto, Y. Shimoda, K. Oda, Y. Wada, T. Masuda, A. Sakakibara, M. Igarashi, T. Miyata, C. Faivre-Sarrailh, K. Takeuchi, and K. Kaibuchi. 2014. Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron*. 81:814-829.
- Nelson, E.A., S.R. Walker, W. Li, X.S. Liu, and D.A. Frank. 2006. Identification of human STAT5-dependent gene regulatory elements based on interspecies homology. *The Journal of biological chemistry*. 281:26216-26224.
- Neves, G., S.F. Cooke, and T.V. Bliss. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature reviews. Neuroscience*. 9:65-75.
- Niethammer, M., D.S. Smith, R. Ayala, J. Peng, J. Ko, M.S. Lee, M. Morabito, and L.H. Tsai. 2000. NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron*. 28:697-711.
- Ninkovic, J., T. Mori, and M. Gotz. 2007. Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27:10906-10911.
- Nishimura, Y.V., T. Shinoda, Y. Inaguma, H. Ito, and K. Nagata. 2012. Application of in utero electroporation and live imaging in the analyses of neuronal migration during mouse brain development. *Medical molecular morphology*. 45:1-6.
- Okamoto, K., M. Bosch, and Y. Hayashi. 2009. The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology*. 24:357-366.
- Okamoto, K., R. Narayanan, S.H. Lee, K. Murata, and Y. Hayashi. 2007. The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:6418-6423.
- Opperman, K., M. Moseley-Alldredge, J. Yochem, L. Bell, T. Kanayinkal, and L. Chen. 2015. A novel nondevelopmental role of the sax-7/L1CAM cell adhesion molecule in synaptic regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 199:497-509.
- Ostergaard, M., G.A. Hansen, H. Vorum, and B. Honore. 2006. Proteomic profiling of fibroblasts reveals a modulating effect of extracellular calumenin on the organization of the actin cytoskeleton. *Proteomics*. 6:3509-3519.
- Palay, S.L. 1956. Synapses in the central nervous system. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 2:193-202.
- Palmer, T.D., A.R. Willhoite, and F.H. Gage. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of comparative neurology*. 425:479-494.

- Paoloni-Giacobino, A., H. Chen, and S.E. Antonarakis. 1997. Cloning of a novel human neural cell adhesion molecule gene (NCAM2) that maps to chromosome region 21q21 and is potentially involved in Down syndrome. *Genomics*. 43:43-51.
- Parcerisas, A., S.E. Rubio, A. Muhaisen, A. Gomez-Ramos, L. Pujadas, M. Puiggros, D. Rossi, J. Urena, F. Burgaya, M. Pascual, D. Torrents, A. Rabano, J. Avila, and E. Soriano. 2014. Somatic signature of brain-specific single nucleotide variations in sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 42:1357-1382.
- Park, Y.K., and Y. Goda. 2016. Integrins in synapse regulation. *Nature reviews. Neuroscience*. 17:745-756.
- Pebusque, M.J., F. Coulier, D. Birnbaum, and P. Pontarotti. 1998. Ancient large-scale genome duplications: phylogenetic and linkage analyses shed light on chordate genome evolution. *Molecular biology and evolution*. 15:1145-1159.
- Perlson, E., A.G. Hendricks, J.E. Lazarus, K. Ben-Yaakov, T. Gradus, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. 2013. Dynein interacts with the neural cell adhesion molecule (NCAM180) to tether dynamic microtubules and maintain synaptic density in cortical neurons. *The Journal of biological chemistry*. 288:27812-27824.
- Pernet, V., and M.E. Schwab. 2012. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell and tissue research*. 349:97-104.
- Petit, F., G. Plessis, M. Decamp, J.M. Cuisset, M. Blyth, M. Pendlebury, and J. Andrieux. 2015. 21q21 deletion involving NCAM2: report of 3 cases with neurodevelopmental disorders. *European journal of medical genetics*. 58:44-46.
- Petkau, T.L., and B.R. Leavitt. 2014. Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends in neurosciences*. 37:388-398.
- Petkau, T.L., S.J. Neal, A. Milnerwood, A. Mew, A.M. Hill, P. Orban, J. Gregg, G. Lu, H.H. Feldman, I.R. Mackenzie, L.A. Raymond, and B.R. Leavitt. 2012. Synaptic dysfunction in progranulin-deficient mice. *Neurobiology of disease*. 45:711-722.
- Petreau, L., and A. Alvarez-Buylla. 2002. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 22:6106-6113.
- Ponti, G., K. Obernier, and A. Alvarez-Buylla. 2013. Lineage progression from stem cells to new neurons in the adult brain ventricular-subventricular zone. *Cell cycle*. 12:1649-1650.
- Poplawski, G.H., A.K. Tranziska, I. Leshchyns'ka, I.D. Meier, T. Streichert, V. Sytnyk, and M. Schachner. 2012. L1CAM increases MAP2 expression via the MAPK pathway to promote neurite outgrowth. *Molecular and cellular neurosciences*. 50:169-178.
- Poulain, F.E., and A. Sobel. 2010. The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Molecular and cellular neurosciences*. 43:15-32.
- Premi, E., S. Gazzina, M. Bozzali, S. Archetti, A. Alberici, M. Cercignani, A. Bianchetti, R. Gasparotti, M. Turla, C. Caltagirone, A. Padovani, and B. Borroni. 2013. Cognitive reserve in granulin-related frontotemporal dementia: from preclinical to clinical stages. *PloS one*. 8:e74762.
- Pujadas, L., A. Gruart, C. Bosch, L. Delgado, C.M. Teixeira, D. Rossi, L. de Lecea, A. Martinez, J.M. Delgado-Garcia, and E. Soriano. 2010. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:4636-4649.
- Qiang, L., W. Yu, A. Andreadis, M. Luo, and P.W. Baas. 2006. Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26:3120-3129.
- Raiker, S.J., H. Lee, K.T. Baldwin, Y. Duan, P. Shrager, and R.J. Giger. 2010. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:12432-12445.
- Rakic, P. 1988. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. *Progress in brain research*. 73:15-37.
- Rasband, M.N. 2010. The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nature reviews. Neuroscience*. 11:552-562.
- Rechsteiner, M., and S.W. Rogers. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in biochemical sciences*. 21:267-271.
- Redies, C., U. Treubert-Zimmermann, and J. Luo. 2003. Cadherins as regulators for the emergence of neural nets from embryonic divisions. *Journal of physiology, Paris*. 97:5-15.

- Redmond, L., and A. Ghosh. 2005. Regulation of dendritic development by calcium signaling. *Cell calcium*. 37:411-416.
- Regehr, W.G., M.R. Carey, and A.R. Best. 2009. Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. *Neuron*. 63:154-170.
- Reiner, O., and T. Sapir. 2013. LIS1 functions in normal development and disease. *Current opinion in neurobiology*. 23:951-956.
- Reissner, C., F. Runkel, and M. Missler. 2013. Neurexins. *Genome biology*. 14:213.
- Ren, J., T. Zhao, Y. Xu, and H. Ye. 2016. Interaction between DISC1 and CHL1 in regulation of neurite outgrowth. *Brain research*. 1648:290-297.
- Rodriguez-Moreno, A., A. Banerjee, and O. Paulsen. 2010. Presynaptic NMDA Receptors and Spike Timing-Dependent Depression at Cortical Synapses. *Frontiers in synaptic neuroscience*. 2:18.
- Rosendahl, J., O. Landt, J. Bernadova, P. Kovacs, N. Teich, H. Bodeker, V. Keim, C. Ruffert, J. Mossner, A. Kage, M. Stumvoll, D. Groneberg, R. Kruger, W. Luck, M. Treiber, M. Becker, and H. Witt. 2013. CFTR, SPINK1, CTRC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut*. 62:582-592.
- Saha, N., M. Kolev, and D.B. Nikolov. 2014. Structural features of the Nogo receptor signaling complexes at the neuron/myelin interface. *Neuroscience research*. 87:1-7.
- Sahay, A., D.A. Wilson, and R. Hen. 2011. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*. 70:582-588.
- Sakakibara, A., and Y. Hatanaka. 2015. Neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Frontiers in neuroscience*. 9:116.
- Sala, C., and M. Segal. 2014. Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiological reviews*. 94:141-188.
- Salinas, P.C., and Y. Zou. 2008. Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annual review of neuroscience*. 31:339-358.
- Sanchez-Huertas, C., F. Freixo, R. Viais, C. Lacasa, E. Soriano, and J. Luders. 2016. Non-centrosomal nucleation mediated by augmin organizes microtubules in post-mitotic neurons and controls axonal microtubule polarity. *Nature communications*. 7:12187.
- Sapir, T., S. Sapoznik, T. Levy, D. Finkelshtein, A. Shmueli, T. Timm, E.M. Mandelkow, and O. Reiner. 2008. Accurate balance of the polarity kinase MARK2/Par-1 is required for proper cortical neuronal migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:5710-5720.
- Sasaki, S., A. Shionoya, M. Ishida, M.J. Gambello, J. Yingling, A. Wynshaw-Boris, and S. Hirotsune. 2000. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron*. 28:681-696.
- Schmid, R.S., R.D. Graff, M.D. Schaller, S. Chen, M. Schachner, J.J. Hemperly, and P.F. Maness. 1999. NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *Journal of neurobiology*. 38:542-558.
- Schmid, R.S., and P.F. Maness. 2008. L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Current opinion in neurobiology*. 18:245-250.
- Scholz, C., D. Steinemann, M. Malzer, M. Roy, M. Arslan-Kirchner, T. Illig, J. Schmidtke, and M. Stuhmann. 2016. NCAM2 deletion in a boy with macrocephaly and autism: Cause, association or predisposition? *European journal of medical genetics*. 59:493-498.
- Seong, E., L. Yuan, and J. Arikath. 2015. Cadherins and catenins in dendrite and synapse morphogenesis. *Cell adhesion & migration*. 9:202-213.
- Seri, B., J.M. Garcia-Verdugo, B.S. McEwen, and A. Alvarez-Buylla. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 21:7153-7160.
- Shapiro, L., J. Love, and D.R. Colman. 2007. Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annual review of neuroscience*. 30:451-474.
- Shaw, A.D., Y. Tiwari, W. Kaplan, A. Heath, P.B. Mitchell, P.R. Schofield, and J.M. Fullerton. 2014. Characterisation of genetic variation in ST8SIA2 and its interaction region in NCAM1 in patients with bipolar disorder. *PloS one*. 9:e92556.
- Shelton, M.A., J.T. Newman, H. Gu, A.R. Sampson, K.N. Fish, M.L. MacDonald, C.E. Moyer, J.V. DiBitetto, K.A. Dorph-Petersen, P. Penzes, D.A. Lewis, and R.A. Sweet. 2015. Loss of Microtubule-Associated Protein 2 Immunoreactivity Linked to Dendritic Spine Loss in Schizophrenia. *Biological psychiatry*. 78:374-385.

- Sheng, L., I. Leshchyns'ka, and V. Sytnyk. 2013. Cell adhesion and intracellular calcium signaling in neurons. *Cell communication and signaling : CCS*. 11:94.
- Sheng, L., I. Leshchyns'ka, and V. Sytnyk. 2015. Neural cell adhesion molecule 2 promotes the formation of filopodia and neurite branching by inducing submembrane increases in Ca<sup>2+</sup> levels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 35:1739-1752.
- Shima, Y., S.Y. Kawaguchi, K. Kosaka, M. Nakayama, M. Hoshino, Y. Nabeshima, T. Hirano, and T. Uemura. 2007. Opposing roles in neurite growth control by two seven-pass transmembrane cadherins. *Nature neuroscience*. 10:963-969.
- Shimoda, Y., and K. Watanabe. 2009. Contactins: emerging key roles in the development and function of the nervous system. *Cell adhesion & migration*. 3:64-70.
- Simo, S., Y. Jossin, and J.A. Cooper. 2010. Cullin 5 regulates cortical layering by modulating the speed and duration of Dab1-dependent neuronal migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:5668-5676.
- Sluchanko, N.N., and N.B. Gusev. 2010. 14-3-3 proteins and regulation of cytoskeleton. *Biochemistry. Biokhimiia*. 75:1528-1546.
- Sogawa, Y., Y. Yoshimura, and T. Yamauchi. 2001. Investigation of the Ca(2+)-independent form of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in neurite outgrowth. *Brain research. Brain research protocols*. 8:159-169.
- Song, H., C.F. Stevens, and F.H. Gage. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. 417:39-44.
- Soriano, E., R.M. Alvarado-Mallart, N. Dumesnil, J.A. Del Rio, and C. Sotelo. 1997. Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron*. 18:563-577.
- Soriano, E., and J.A. Del Rio. 2005. The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron*. 46:389-394.
- Sousa, R., and E.M. Lafer. 2015. The role of molecular chaperones in clathrin mediated vesicular trafficking. *Frontiers in molecular biosciences*. 2:26.
- Speese, S.D., N. Trotta, C.K. Rodesch, B. Aravamudan, and K. Broadie. 2003. The ubiquitin proteasome system acutely regulates presynaptic protein turnover and synaptic efficacy. *Current biology : CB*. 13:899-910.
- Spitzer, N.C. 2006. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*. 444:707-712.
- Stepanova, T., J. Slemmer, C.C. Hoogenraad, G. Lansbergen, B. Dortland, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld, G. van Cappellen, A. Akhmanova, and N. Galjart. 2003. Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 23:2655-2664.
- Sudo, H., and P.W. Baas. 2010. Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:7215-7226.
- Super, H., E. Soriano, and H.B. Uylings. 1998. The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Brain Res Rev*. 27:40-64.
- Sur, M., and J.L. Rubenstein. 2005. Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science*. 310:805-810.
- Suzuki, T., N. Usuda, S. Murata, A. Nakazawa, K. Ohtsuka, and H. Takagi. 1999. Presence of molecular chaperones, heat shock cognate (Hsc) 70 and heat shock proteins (Hsp) 40, in the postsynaptic structures of rat brain. *Brain research*. 816:99-110.
- Sytnyk, V., I. Leshchyns'ka, and M. Schachner. 2017. Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily Regulate Synapse Formation, Maintenance, and Function. *Trends in neurosciences*. 40:295-308.
- Szebenyi, G., F. Bollati, M. Bisbal, S. Sheridan, L. Faas, R. Wray, S. Haferkamp, S. Nguyen, A. Caceres, and S.T. Brady. 2005. Activity-driven dendritic remodeling requires microtubule-associated protein 1A. *Current biology : CB*. 15:1820-1826.
- Tabata, H., and K. Nakajima. 2001. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience*. 103:865-872.
- Tahirovic, S., and F. Bradke. 2009. Neuronal polarity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 1:a001644.

- Takahashi, S., K. Kato, K. Nakamura, R. Nakano, K. Kubota, and H. Hamada. 2011. Neural cell adhesion molecule 2 as a target molecule for prostate and breast cancer gene therapy. *Cancer science*. 102:808-814.
- Takai, Y., W. Ikeda, H. Ogita, and Y. Rikitake. 2008. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annual review of cell and developmental biology*. 24:309-342.
- Takano, T., C. Xu, Y. Funahashi, T. Namba, and K. Kaibuchi. 2015. Neuronal polarization. *Development*. 142:2088-2093.
- Takashima, S., K. Iida, T. Mito, and M. Arima. 1994. Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *Journal of intellectual disability research : JIDR*. 38 ( Pt 3):265-273.
- Takeichi, M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*. 102:639-655.
- Tang, Y., P. Lv, Z. Sun, L. Han, B. Luo, and W. Zhou. 2015. 14-3-3zeta up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha in hepatocellular carcinoma via activation of PI3K/Akt/NF-small ka, CyrillicB signal transduction pathway. *International journal of clinical and experimental pathology*. 8:15845-15853.
- Tanoue, T., and M. Takeichi. 2004. Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cell-cell contact. *The Journal of cell biology*. 165:517-528.
- Teixeira, C.M., M.M. Kron, N. Masachs, H. Zhang, D.C. Lagace, A. Martinez, I. Reillo, X. Duan, C. Bosch, L. Pujadas, L. Brunso, H. Song, A.J. Eisch, V. Borrell, B.W. Howell, J.M. Parent, and E. Soriano. 2012. Cell-autonomous inactivation of the reelin pathway impairs adult neurogenesis in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 32:12051-12065.
- Tian, J., C. Tian, Y. Ding, Z. Li, Q. Geng, Z. Xiahou, J. Wang, W. Hou, J. Liao, M.Q. Dong, X. Xu, and J. Li. 2015. Aurora B-dependent phosphorylation of Ataxin-10 promotes the interaction between Ataxin-10 and Plk1 in cytokinesis. *Scientific reports*. 5:8360.
- Toni, N., and A.F. Schinder. 2015. Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 8:a018903.
- Tortosa, E., C. Montenegro-Venegas, M. Benoist, S. Hartel, C. Gonzalez-Billault, J.A. Esteban, and J. Avila. 2011. Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *The Journal of biological chemistry*. 286:40638-40648.
- Tost, H., E. Bilek, and A. Meyer-Lindenberg. 2012. Brain connectivity in psychiatric imaging genetics. *NeuroImage*. 62:2250-2260.
- Toyo-oka, K., A. Shionoya, M.J. Gambello, C. Cardoso, R. Leventer, H.L. Ward, R. Ayala, L.H. Tsai, W. Dobyns, D. Ledbetter, S. Hirotsune, and A. Wynshaw-Boris. 2003. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nature genetics*. 34:274-285.
- Trachtenberg, J.T., B.E. Chen, G.W. Knott, G. Feng, J.R. Sanes, E. Welker, and K. Svoboda. 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*. 420:788-794.
- Treloar, H.B., D. Gabeau, Y. Yoshihara, K. Mori, and C.A. Greer. 2003. Inverse expression of olfactory cell adhesion molecule in a subset of olfactory axons and a subset of mitral/tufted cells in the developing rat main olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology*. 458:389-403.
- Trikamji, B., P. Singh, and S. Mishra. 2015. Spinocerebellar ataxia-10 with paranoid schizophrenia. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 18:93-95.
- Tsai, L.H., and J.G. Gleeson. 2005. Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron*. 46:383-388.
- Urbanska, M., M. Blazejczyk, and J. Jaworski. 2008. Molecular basis of dendritic arborization. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 68:264-288.
- Vaillant, A.R., P. Zanassi, G.S. Walsh, A. Aumont, A. Alonso, and F.D. Miller. 2002. Signaling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron*. 34:985-998.
- Vallee, R.B., R.J. McKenney, and K.M. Ori-McKenney. 2012. Multiple modes of cytoplasmic dynein regulation. *Nature cell biology*. 14:224-230.
- Vallee, R.B., and J.W. Tsai. 2006. The cellular roles of the lissencephaly gene LIS1, and what they tell us about brain development. *Genes & development*. 20:1384-1393.
- Valnegri, P., S.V. Puram, and A. Bonni. 2015. Regulation of dendrite morphogenesis by extrinsic cues. *Trends in neurosciences*. 38:439-447.



- Van Aelst, L., and H.T. Cline. 2004. Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Current opinion in neurobiology*. 14:297-304.
- Van Damme, P., A. Van Hoecke, D. Lambrechts, P. Vanacker, E. Bogaert, J. van Swieten, P. Carmeliet, L. Van Den Bosch, and W. Robberecht. 2008. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *The Journal of cell biology*. 181:37-41.
- Vasiljevic, M., F.F. Heisler, T.J. Hausrat, S. Fehr, I. Milenkovic, M. Kneussel, and W. Sieghart. 2012. Spatio-temporal expression analysis of the calcium-binding protein calumenin in the rodent brain. *Neuroscience*. 202:29-41.
- von Campenhausen, H., Y. Yoshihara, and K. Mori. 1997. OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. *Neuroreport*. 8:2607-2612.
- Wachi, T., B. Cornell, and K. Toyo-Oka. 2017. Complete ablation of the 14-3-3epsilon protein results in multiple defects in neuropsychiatric behaviors. *Behavioural brain research*. 319:31-36.
- Waites, C.L., A.M. Craig, and C.C. Garner. 2005. Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annual review of neuroscience*. 28:251-274.
- Walsh, F.S., K. Meiri, and P. Doherty. 1997. Cell signalling and CAM-mediated neurite outgrowth. *Society of General Physiologists series*. 52:221-226.
- Walz, A., P. Mombaerts, C.A. Greer, and H.B. Treloar. 2006. Disrupted compartmental organization of axons and dendrites within olfactory glomeruli of mice deficient in the olfactory cell adhesion molecule, OCAM. *Molecular and cellular neurosciences*. 32:1-14.
- Wang, Q., I. Klyubin, S. Wright, I. Griswold-Prenner, M.J. Rowan, and R. Anwyl. 2008. Alpha v integrins mediate beta-amyloid induced inhibition of long-term potentiation. *Neurobiology of aging*. 29:1485-1493.
- Waragai, M., S. Nagamitsu, W. Xu, Y.J. Li, X. Lin, and T. Ashizawa. 2006. Ataxin 10 induces neuritogenesis via interaction with G-protein beta2 subunit. *Journal of neuroscience research*. 83:1170-1178.
- Weng, M.T., and J. Luo. 2013. The enigmatic ERH protein: its role in cell cycle, RNA splicing and cancer. *Protein & cell*. 4:807-812.
- West, A.E., and M.E. Greenberg. 2011. Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3.
- Wheeler, D.G., R.D. Groth, H. Ma, C.F. Barrett, S.F. Owen, P. Safa, and R.W. Tsien. 2012. Ca(V)1 and Ca(V)2 channels engage distinct modes of Ca(2+) signaling to control CREB-dependent gene expression. *Cell*. 149:1112-1124.
- Williams, E.J., B. Mittal, F.S. Walsh, and P. Doherty. 1995. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase inhibitor, KN-62, inhibits neurite outgrowth stimulated by CAMs and FGF. *Molecular and cellular neurosciences*. 6:69-79.
- Witte, H., D. Neukirchen, and F. Bradke. 2008. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of cell biology*. 180:619-632.
- Wong, R.O., and A. Ghosh. 2002. Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nature reviews. Neuroscience*. 3:803-812.
- Wong, W.T., and R.O. Wong. 2000. Rapid dendritic movements during synapse formation and rearrangement. *Current opinion in neurobiology*. 10:118-124.
- Wu, G.Y., D.J. Zou, I. Rajan, and H. Cline. 1999. Dendritic dynamics in vivo change during neuronal maturation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 19:4472-4483.
- Xu, L.L., Y.P. Su, R. Labiche, T. Segawa, N. Shanmugam, D.G. McLeod, J.W. Moul, and S. Srivastava. 2001. Quantitative expression profile of androgen-regulated genes in prostate cancer cells and identification of prostate-specific genes. *International journal of cancer*. 92:322-328.
- Yagi, T. 2008. Clustered protocadherin family. *Development, growth & differentiation*. 50 Suppl 1:S131-140.
- Yamada, M., S. Hirotsune, and A. Wynshaw-Boris. 2010. The essential role of LIS1, NDEL1 and Aurora-A in polarity formation and microtubule organization during neurogenesis. *Cell adhesion & migration*. 4:180-184.
- Yamagata, M., J.R. Sanes, and J.A. Weiner. 2003. Synaptic adhesion molecules. *Current opinion in cell biology*. 15:621-632.
- Yang, G., F. Pan, and W.B. Gan. 2009. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*. 462:920-924.
- Yang, Y., and N. Calakos. 2013. Presynaptic long-term plasticity. *Frontiers in synaptic neuroscience*. 5:8.

- Yau, K.W., P. Schatzle, E. Tortosa, S. Pages, A. Holtmaat, L.C. Kapitein, and C.C. Hoogenraad. 2016. Dendrites In Vitro and In Vivo Contain Microtubules of Opposite Polarity and Axon Formation Correlates with Uniform Plus-End-Out Microtubule Orientation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 36:1071-1085.
- Yoshihara, Y., M. Kawasaki, A. Tamada, H. Fujita, H. Hayashi, H. Kagamiyama, and K. Mori. 1997. OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 17:5830-5842.
- Yoshimura, Y., Y. Yamauchi, T. Shinkawa, M. Taoka, H. Donai, N. Takahashi, T. Isobe, and T. Yamauchi. 2004. Molecular constituents of the postsynaptic density fraction revealed by proteomic analysis using multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of neurochemistry*. 88:759-768.
- Yu, R.K., and M. Yanagisawa. 2006. Glycobiology of neural stem cells. *CNS & neurological disorders drug targets*. 5:415-423.
- Zagrebelsky, M., R. Schweigreiter, C.E. Bandtlow, M.E. Schwab, and M. Korte. 2010. Nogo-A stabilizes the architecture of hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:13220-13234.
- Zalutsky, R.A., and R.A. Nicoll. 1990. Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science*. 248:1619-1624.
- Zraggen, E., M. Boitard, I. Roman, M. Kanemitsu, G. Potter, P. Salmon, L. Vutskits, A.G. Dayer, and J.Z. Kiss. 2012. Early postnatal migration and development of layer II pyramidal neurons in the rodent cingulate/retrosplenial cortex. *Cerebral cortex*. 22:144-157.
- Zhang, W., M.S. Xiao, S. Ji, J. Tang, L. Xu, X. Li, M. Li, H.Z. Wang, H.Y. Jiang, D.F. Zhang, J. Wang, S. Zhang, X.F. Xu, L. Yu, P. Zheng, X. Chen, and Y.G. Yao. 2014. Promoter variant rs2301228 on the neural cell adhesion molecule 1 gene confers risk of schizophrenia in Han Chinese. *Schizophrenia research*. 160:88-96.
- Zhang, Z., H. Yu, S. Jiang, J. Liao, T. Lu, L. Wang, D. Zhang, and W. Yue. 2015. Evidence for Association of Cell Adhesion Molecules Pathway and NLGN1 Polymorphisms with Schizophrenia in Chinese Han Population. *PloS one*. 10:e0144719.
- Zhao, S., X. Chai, E. Forster, and M. Frotscher. 2004. Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development*. 131:5117-5125.
- Zheng, J.Q., and M.M. Poo. 2007. Calcium signaling in neuronal motility. *Annual review of cell and developmental biology*. 23:375-404.
- Zheng, Y., J. Wildonger, B. Ye, Y. Zhang, A. Kita, S.H. Younger, S. Zimmerman, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2008. Dynein is required for polarized dendritic transport and uniform microtubule orientation in axons. *Nature cell biology*. 10:1172-1180.
- Zhu, K., Y. Xu, J. Liu, Q. Xu, and H. Ye. 2011. Down syndrome cell adhesion molecule and its functions in neural development. *Neuroscience bulletin*. 27:45-52.



# Apèndix



Taula A.1 Proteïnes obtingudes en l'experiment de masses

		Assay 1				Assay 2			
		NCAM2.1		NCAM2		NCAM2.1		NCAM2	
Protein	Ppts T	Ppts	PSMs	Ppts	PSMs	Ppts	PSMs	Ppts	PSMs
Microtubule-associated protein 2 (Map2)	24	4	5			22	49		
Neurofilament light polypeptide (Nefl)	20	6	6			20	65		
Actin, cytoplasmic 1 (Actb)	19	9	11	1	1	17	72	2	2
Neurofilament medium polypeptide (Nefm)	19	3	3			19	42		
Tubulin beta-4A (Tubb4a)	18					18	63		
Alpha-internexin (Ina)	17	1	1			17	44		
Tubulin alpha-1A (Tuba1a)	13	3	3			13	54	1	2
Tubulin alpha-1C (Tuba1c)	12	3	3					1	2
Actin, alpha cardiac muscle 1 (Actc1)	11	5	5	1	1	10	37		
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II beta (Camk2b)	11					11	33		
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha (Camk2a)	10	1	1			10	34		
Microtubule-associated protein 1B (Map1b)	9					9	22		
Beta-actin-like protein 2 (Actbl2)	8					7	32		
F-actin-capping protein beta (Capzb)	8					8	16		
14-3-3 protein zeta/delta (Ywhaz)	8					8	11	1	1
Tubulin beta-6 chain (Tubb6)	7			1	1				
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta (Camk2d)	6					6	16		
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma (Camk2g)	6					6	16		
14-3-3 protein gamma (Ywhag)	6					6	11	1	1
Enhancer of rudimentary homolog (Erh)	5	2	2			5	24		
Thioredoxin-dependent peroxide reductase (Prdx3)	5	3	4			4	16		
Heat shock cognate 71 kDa protein (Hspa8)	5	4	4	1	1	2	3	1	1
F-actin-capping protein alpha-2 (Capza2)	4					4	8		
Calumenin (Calu)	4	1	1			3	3		
Heat shock factor-binding protein 1 (Hsbp1)	3			1	2	3	12	3	11
Granulins (Grn)	3	2	2	3	4	1	2	3	3
Reticulocalbin-2 (Rcn2)	3					2	4	3	6
Elongation factor 1-beta (Eef1b)	3	2	2			3	7		
14-3-3 protein epsilon (Ywhae)	3					3	5	1	1
Hemoglobin beta-1 (Hbb-b1)	3					3	5		
Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (Ybx1)	3					3	5		
UPF0568 protein C14orf166 homolog (Cn166)	3					3	5		
Elongation factor 1-delta (Eef1d)	3	1	2			2	2		
Dynein light chain 1, cytoplasmic (Dylnl1)	2	1	2			2	3	1	2
Myosin light polypeptide 6 (Myl6)	2					2	7		
Barrier-to-autointegration factor (Banf1)	2					2	6		
Dynein light chain 2, cytoplasmic (Dylnl2)	2	2	3					1	2
60S acidic ribosomal protein P2 (Rplp2)	2	1	1			2	4		
Complement component 1 Q	2	2	3						

subcomponent-binding protein, mitochondrial (C1qbp)									
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 (Itih3)	2					2	3		
Reticulon-4 (Rtn4)	2					2	3		
Ig kappa chain V-III region PC 2413 (Kv3a5)	1							1	8
Ataxin-10 (Atxn10)	1	1	2			1	3		
Protein LSM12 homolog (Lsm12)	1	1	1			1	3		
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H (Eif3h)	1					1	3		
Annexin A2 (Anxa2)	1	1	1	1	1				
Calmodulin (Calm1)	1			1	1	1	1		
FAST kinase domain-containing protein 2 (Fastkd2)	1					1	2		
Haptoglobin (Hp)	1					1	2		
Hippocalcin-like protein 1 (Hpcal1)	1					1	1	1	1
Ras-related protein Rab-33A (Rab33a)	1					1	1	1	1
Ubiquitin-protein ligase E3B (Ube3b)	1					1	2		
60S acidic ribosomal protein P1 (Rplp1)	1					1	1		
Adenomatous polyposis coli protein 2 (Apc2)	1			1	1				
BRCA1-associated RING domain protein 1 (Bard1)	1							1	1
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform(Cpt1a)	1							1	1
Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1 (Cend1)	1							1	1
Coiled-coil domain-containing protein 117 (Ccdc117)	1							1	1
Coiled-coil domain-containing protein 39 (Ccdc39)	1					1	1		
Coiled-coil domain-containing protein 84 (Ccdc84)	1					1	1		
Collagen alpha-1(XIV) chain (Col14a1)	1					1	1		
Collectin-11 (Colec11)	1					1	1		
Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4 (Ndufa4)	1					1	1		
Desmoglein-1-alpha (Dsg1a)	1			1	1				
DNA helicase INO80 (Ino80)	1					1	1		
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F (Eif3f)	1					1	1		
Exportin-6 (Xpo6)	1					1	1		
Ferritin heavy chain (Fth1)	1					1	1		
Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 1 (Fut1)	1							1	1
Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 2 (B3gat2)	1							1	1
Galectin-9 (Lgals9)	1					1	1		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)	1					1	1		
GRB2-associated-binding protein 2 (Gab2)	1					1	1		
Lysozyme C-1 (Lyz1)	1	1	1						
Matrilin-2 (Matn2)	1	1	1						
MPN domain-containing protein (Mpnd)	1							1	1
N-acylgucosamine 2-epimerase (Renbp)	1					1	1		
Non-lysosomal glucosylceramidase (Gba2)	1							1	1

NudC domain-containing protein 2 (Nudcd2)	1	1	1						
PAX-interacting protein 1 (Paxip1)	1					1	1		
Protein broad-minded (Tbc1d32)	1							1	1
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (Pdhb)	1					1	1		
Rab GTPase-activating protein 1 (Rabgap1)	1					1	1		
Rootletin (Crocc)	1					1	1		
Serine protease 28 (Prss28)	1					1	1		
Signal recognition particle subunit SRP68 (Srp68)	1					1	1		
Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial (Ssbp1)	1					1	1		
Solute carrier family 7 member 13 (Slc7a13)	1							1	1
Stimulated by retinoic acid gene 8 protein (Stra8)	1							1	1
Sushi domain-containing protein 2 (Susd2)	1					1	1		
Synaptotagmin-like protein 5 (Syt5)	1					1	1		
Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B (Thsd7b)	1	1	1						
Transferrin receptor protein 1 (Tfrc)	1							1	1
Transmembrane protease serine 5 (Tmprss5)	1					1	1		
Tripartite motif-containing protein 75 (Trim75)	1							1	1
Tumor protein D52 (Tpd52)	1					1	1		
Tyrosine-protein kinase JAK1 (Jak1)	1					1	1		
Unconventional myosin-1b (Myo1b)	1							1	1
UPF0577 protein KIAA1324 (Kiaa1324)	1					1	1		
UPF0704 protein C6orf165 homolog	1					1	1		
Vesicle-fusing ATPase (Nsf)	1	1	1						
WD repeat-containing protein 6 (Wdr6)	1							1	1
YEATS domain-containing protein 2 (Yeats2)	1					1	1		

**Taula A.1.** Llista total de les proteïnes detectades en l'experiment d'espectrometria de masses.

Les proteïnes estan ordenades per pèptids únics detectats en el total dels dos experiments, PptsT. Entre parèntesis hi ha el nom del gen que codifica la proteïna. La columna Ncam2.1 correspon a les proteïnes detectades en immunoprecipitar amb l'anticòs específic per aquesta isoforma. La columna Ncam2 correspon a les proteïnes detectades en immunoprecipitar amb l'anticòs general de Ncam2. La columna PSMs, correspon als pèptids detectats i els Ppts, els pèptids únics. Un pèptid únic es pot haver detectat més d'un cop per això el valor més elevat de PSMs respecta el PPTs.



**Taula A.2 Proteïnes obtingudes en l'experiment de masses en el control negatiu**

Protein	PSM total	Assay 1			Assay 2		
		-	Ncam2.1	Ncam2	-	Ncam2.1	Ncam2
Keratin, type II cytoskeletal 1 (Krt1)	61			10	16		
Desmoplakin (Dsp)	8			5	2		1
Elongation factor 2 (Eef2)	8				2	2	4
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial (Uqcrh)	8			1	2	2	3
60S ribosomal protein L23a (Rpl23a)	6				2	3	1
Myelin basic protein (Mbp)	15				2	9	4
Tubulin beta-2A chain (Tubb2a)	102		2	1	1	76	22
Tubulin beta-5 chain (Tubb5)	96		2	1	1	71	21
Tubulin beta-3 chain (Tubb3)	44			1	1	32	
Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1 (Magi1)	1				1		
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 2 (Hsd17b2)	1				1		
Dedicator of cytokinesis protein 7 (Dock7)	1				1		
Nipped-B-like protein (Nipbl)	3				1	2	
Laminin subunit alpha-2 (Lama2)	2				2		
NF-kappa-B inhibitor-interacting Ras-like protein 2 (Nkiras2)	1				1		
Apoptosis facilitator Bcl-2-like protein 14 (Bcl2l14)	1				1		
Sperm-associated antigen 16 protein (Spag16)	1				1		
Polyubiquitin-B (Ubb)	1	1					
Junction plakoglobin (Jup)	9	1		8			
BTB/POZ domain-containing adapter for CUL3-mediated RhoA degradation protein 1 (Kctd13)	1	1					
Leucine-rich repeat-containing protein 18 (Lrrc18)	1	1					
Sortilin-related receptor (Sorl1)	1	1					

**Taula A.2. Llista total de les proteïnes detectades en l'experiment d'espectrometria de masses.**

Les proteïnes detectades amb sol pèptid al control negatiu van ser eliminades de la llista R.5.1, totes les proteïnes detectades al control negatiu dels dos experiments es mostren en la llista R.5.2, només hi ha representat els PSMs de les diferents condicions i el total.

**Taula A.3 Llistat de les vies implicades en processos biològics amb la llista de proteïnes detectades**

Biological Process	pathway description	genes	false discovery rate
GO:0016043	cellular component organization	(23) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1a, Tuba1c, Camk2a, Map1b, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Grn, Rcn2, Dynll1, Dynll2, Rtn4, Eif3h i Calm1	0.00322
GO:0021762	substantia nigra development	(4) Actb, Ina, Ywhae i Dynll1	0.00322
GO:0022607	cellular component assembly	(14) Nefl, Nefm, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, C1qbp, Atxn10, Anxa2 i Eif3H	0.00322
GO:0051258	protein polymerization	(5) Nefl, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c i Tubb6	0.00322
GO:0060052	neurofilament cytoskeleton organization	(3) Nefl, Nefm i Ina	0.00322
GO:0043933	macromolecular complex subunit organization	(14) Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Camk2d, Camk2g, , Hspa8, C1qbp, Atxn10, Eif3h i Anxa2	0.00608
GO:0065003	macromolecular complex assembly	(11) Nefl, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Camk2d, Camk2g, C1qbp, Atxn10, Eif3h i Anxa2	0.00608
GO:0044085	cellular component biogenesis	(14) Nefl, Nefm, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Capzb, Ywhaz, Camk2d, Camk2g, C1qbp, Atxn10, Eif3h i Anxa2	0.00674
GO:0046907	intracellular transport	(11) Nefl, Nefm, Camk2a, Map1b, Ywhaz, Ywhag, Ywhae, Dynll1, Dynll2, Anxa2, Rab33a	0.00674
GO:0007017	microtubule-based process	(8) Map2, Nefl, Nefm, Tubb4a, Tuba1c, Tubb6, Map1b, Dynll2	0.00697
GO:0071822	protein complex subunit organization	(11) Nefl, Nefm, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Camk2d, Camk2g, , Hspa8, Atxn10, i Anxa2	0.00797
GO:0000082	G1/S transition of mitotic cell cycle	(4) Camk2a, Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.0128
GO:0006414	translational elongation	(3) Eef1d, Eef1b2 i Rplp2	0.0128
GO:0030901	midbrain development	(4) Actb, Dynll1, Ywhae i Ina	0.0138
GO:0007275	multicellular organismal development	(21) Actb, Nefm, Ina, Actc1, Camk2b, Map1b, Capzb, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Calu, Hsbp1, Grn, Ybx1, Dynll1, Myl6, Dynll2, Rtn4, Atxn10, Anxa2, Hp	0.014
GO:0032535	regulation of cellular component size	(6) Nefl, Nefm, Map1b, Capzb, Capza2 i Rtn4	0.014
GO:0010769	regulation of cell morphogenesis involved in differentiation	(6) Nefl, Nefm, Map1b, C1qbp, Camk2b i Rtn4	0.0149
GO:0009987	cellular process	(37) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Map1b, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Hsbp1, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Calm1, Hp, Hpcal1, Rab33a i Ube3b	0.0153
GO:0006461	protein complex assembly	(9) Nefl, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Atxn10 i Anxa2	0.0156
GO:0048699	generation of neurons	(11) Nefl, Nefm, Camk2b, Map1b, Ywhag, Ywhae, Calu, Dynll1, Dynll2, Rtn4 i Atx10	0.0156
GO:0070271	protein complex biogenesis	(9) Nefl, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Atxn10 i Anxa2	0.0156
GO:1901897	regulation of relaxation of cardiac muscle	(2) Camk2d i Camk2g	0.0156
GO:0022604	regulation of cell morphogenesis	(7) Nefl, Nefm, Camk2b, Capzb, Map1b, Rtn4 i Atxn10	0.0176
GO:0014012	peripheral nervous system axon regeneration	(2) Calu i Nefl	0.0208
GO:0030030	cell projection organization	(9) Map2, Nefl, Tubb4a, Map1b, Capzb, Calu, Dynll1, Rtn4 i Atxn10	0.0208
GO:0045110	intermediate filament bundle assembly	(2) Nefl i Nefm	0.0208
GO:0048869	cellular developmental process	(18) Nefl, Nefm, Capzb, Map1b, Ina, Camk2b, Camk2g, Calu, Ywhae, Ywhag, Dynll1, Dynll2, Erh, Rtn4, Hsbp1, Prdx3, Atxn10 i Anxa2	0.0208
GO:1902582	single-organism intracellular	(9) Nefl, Nefm, Map1b, Camk2a, Ywhae, Ywhag,	0.0208

	<b>transport</b>	Ywhaz, Dynll1, Anxa2	
GO:0007399	<b>nervous system development</b>	(13) Nefl, Actb, Camk2b, Capzb, Camk2g, Map1b, Ina, Ywhag, Calu, Dynll1, Dynll2, Rtn4 i Atxn10	0.0216
GO:0010970	<b>microtubule-based transport</b>	(4) Nefl, Nefm, Dynll1 i Map1b	0.0216
GO:0031133	<b>regulation of axon diameter</b>	(2) Nefl i Nefm	0.0235
GO:0031175	<b>neuron projection development</b>	(7) Map2, Nefl, Capzb, Map1b, Calu, Rtn4 i Atxn10	0.0235
GO:0034622	<b>cellular macromolecular complex assembly</b>	(7) Nefl, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Tubb6, C1qbp i Eif3h	0.0235
GO:0044763	<b>single-organism cellular process</b>	(32) Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Actc1, Camk2b, Camk2a, Map1b, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Hsbp1, Ywhae, Eef1d, Myl6, Dynll2, C1qbp, Itih3, Rtn4, Atxn10, Calm1, Fastkd2, Hp, Hpcal1, Rab33a	0.0235
GO:0030154	<b>cell differentiation</b>	(17) Nefl, Nefm, Capzb, Map1b, Ina, Camk2b, Camk2g, Calu, Ywhae, Ywhag, Dynll2, Erh, Rtn4, Hsbp1, Prdx3, Atxn10 i Anxa2	0.0263
GO:0048856	<b>anatomical structure development</b>	(20) Nefm, Actc1, Actb, Capzb, Map1b, Grn, Ina, Camk2b, Camk2g, Calu, Ywhag, Dynll2, Myl6, Rtn4, Hsbp1, Ybx1, Prdx3, Hp, Atxn10 i Anxa2	0.0297
GO:0065008	<b>regulation of biological quality</b>	(15) Nefl, Nefm, Capzb, Map1b, Camk2b, Camk2a, Ywhaz, Ywhae, Ywhag, Dynll1, Erh, Ybx1, Prdx3, Rtn4 i Anxa2	0.0305
GO:0048731	<b>system development</b>	(18) Nefm, Actc1, Actb, Ina, Capzb, Map1b, Camk2b, Camk2g, Calu, Ywhag, Dynll2, , Dynll1, Myl6, Rtn4, Prdx3, Hp, Atxn10 i Anxa2	0.0345
GO:0050770	<b>regulation of axonogenesis</b>	(4) Nefl, Nefm, Map1b i Rtn4	0.0345
GO:0044767	<b>single-organism developmental process</b>	(21) Nefm, Actc1, Actb, Capzb, Map1b, Grn, Ina, Erh, Camk2b, Camk2g, Calu, Ywhag, Dynll2, Myl6, Rtn4, Hsbp1, Ybx1, Prdx3, Hp, Atxn10 i Anxa2	0.0372

**Taula A.3** Llista total dels processos biològics enriquits en l'anàlisi d'ontologies del gen.

Tots els processos biològics amb un enriquiment en l'anàlisi de GO. L'anàlisi s'ha realitzat amb les proteïnes de la taula R.5.1. Cada procés té associat un nombre de gens i un llistat amb les abreviacions dels gens. Programa de "String consortium" versió 10.0.

Taula A.4 Llistat de les vies implicades en funcions moleculars amb la llista de proteïnes detectades

Molecular function	pathway description	genes	false discovery rate
GO:0097159	organic cyclic compound binding	(28) Map2, Actb, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Actc1, Camk2b, Camk2a, Actbl2, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Erh, Hspa8, Calu, Grn, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Banf1, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Anxa2, Fastkd2 i Rab33a	4.74e-05
GO:1901363	heterocyclic compound binding	(28) Map2, Actb, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Actc1, Camk2b, Camk2a, Actbl2, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Erh, Hspa8, Calu, Grn, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Banf1, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Anxa2, Fastkd2 i Rab33a	4.74e-05
GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	(5) Nefl, Tuba1c, Tubb4a, Tuba1a i Tubb6	8.22e-05
GO:0003723	RNA binding	(15) Map2, Ywhaz, Erh, Hspa8, Grn, Eef1b, Ywhae, Ywhag, Ybx1, Eef1d, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Anxa2, Fastkd2	0.000136
GO:0005488	binding	(37) Map2, Nefl, Tubb4a, Tuba1a, Tuba1c, Actc1, Camk2b, Camk2a, Map1b, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Erh, Prdx3, Hspa8, Calu, Grn, Rcn2, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Dynll1, Myl6, Banf1, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Calm1, Fastkd2, Hp, Hpcal1 i Rab33a	0.000167
GO:0044822	poly(A) RNA binding	(13) Map2, Ywhaz, Erh, Hspa8, Grn, Ywhae, Ywhag, Ybx1, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Anxa2, Fastkd2	0.000195
GO:0005198	structural molecule activity	(9) Nefl, Nefm, Tuba1c, Tubb4a, Tuba1a, Tubb6, Ina, Myl6 i Rplp2	0.000201
GO:0004683	calmodulin-dependent protein kinase activity	(4) Camk2b, Camk2a, Camk2d i Camk2g	0.000279
GO:0003674	molecular_function	(39) Map2, Nefl, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Map1b, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Erh, Prdx3, Hspa8, Grn, Rcn2, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Dynll1, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Itih3, Rtn4, Eif3h, Calm1, Hp, Hpcal1, Rab33a i Ube3b	0.000865
GO:0005519	cytoskeletal regulatory protein binding	(2) Map2 i Map1b	0.00193
GO:0017111	nucleoside-triphosphatase activity	(9) Hspa8, Dynll2, Dynll1, Tuba1c, Tubb4a, Tuba1a, Tubb6, Rab331 i Myl6	0.00222
GO:0097367	carbohydrate derivative binding	(15) Map2, Actb, Tuba1a, Tubb4a, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Actbl2, Actc1, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Hspa8, C1qbp i Rab33a	0.00396
GO:0005515	protein binding	(23) Map2, Nefl, Actb, Tuba1a, Actc1, Camk2b, Camk2a, Map1b, Capzb, Ywhaz, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Dynll1, C1qbp, Anxa2, Calm1 i Hp	0.00462
GO:0032550	purine ribonucleoside binding	(13) Actb, Tuba1a, Actc1, Actb2, Camk2b, Tuba1c, Tubb4a, Tubb6, Camk2a, Camk2d, Camk2g, Hspa8 i Rab33a	0.00863
GO:0035639	purine ribonucleoside triphosphate binding	(13) Actb, Tuba1a, Actc1, Actb2, Camk2b, Tuba1c, Tubb4a, Tubb6, Camk2a, Camk2d, Camk2g, Hspa8 i Rab33a	0.00863
GO:0032555	purine ribonucleotide binding	(13) Actb, Tuba1a, Actc1, Actb2, Camk2b, Tuba1c, Tubb4a, Tubb6, Camk2a, Camk2d, Camk2g, Hspa8 i Rab33a	0.00922
GO:0030235	nitric-oxide synthase regulator activity	(2) Calm1 i Dynll1	0.0115
GO:0003924	GTPase activity	(5) Tuba1a, Tuba1c, Tubb4a, Tubb6, i Rab33a	0.0116
GO:0003676	nucleic acid binding	(17) Map2, Actb, Ywhaz, Ywhag, Erh, Hspa8, Grn, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Banf1, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Fastkd2 i Anxa2	0.0157
GO:0008092	cytoskeletal protein binding	(7) Map2, Actb, Actc1, Capzb, Map1b, Camk2d i Ywhag	0.0157
GO:0043168	anion binding	(15) Actb, Tuba1a, Tubb4a, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Actc1, Actbl2, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Prdx3, Hspa8, Ywhae i Rab33a	0.0157
GO:0042802	identical protein binding	(9) Actb, Nefl, Ywhaz, Dynll1, Camk2a, Camk2b, Camk2g, Camk2d i Prdx3	0.0381

GO:0023026	<b>MHC class II protein complex binding</b>	(2) Hspa8 i Ywhae	0.0406
GO:0036094	<b>small molecule binding</b>	(14) Actb, Tuba1a, Tubb4a, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Actc1, Actbl2, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Hspa8, Ywhae i Rab33a	0.0425
GO:0019904	<b>protein domain specific binding</b>	(6) Tuba1a, Hspa8, Dynll1, Ywhaz, Ywhae i Ywhag	0.0437
GO:0008134	<b>transcription factor binding</b>	(6) Hspa8, Actb, Ywhaz, Eef1d, C1qbp i Ybx1	0.0481

**Taula A.4 Llista total de les funcions moleculars enriquides en l'anàlisi d'ontologies del gen.**

Les funcions moleculars detectades amb un enriquiment en l'anàlisi de GO. L'anàlisi s'ha realitzat amb les proteïnes de la taula R.5.1. Cada funció té associada un nombre de gens i un llistat amb les abreviacions dels gens. Programa de "String consortium" versió 10.0.

Taula A.5 Llistat de les vies implicades en components cel·lulars amb la llista de proteïnes detectades

Cellular Component	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0042995	cell projection	(20) Map2, Nefm, Tubb4a, Actc1, Camk2b, Camk2a, Map1b, Capzb, Camk2d, Camk2g, Hspa8, Capza2, Ywhae, Myl6, Dynll1, C1qbp, Rtn4, Atxn10, Calm1 i Anxa2	1.08e-08
GO:0043209	myelin sheath	(10) Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Prdx3, Hspa8, Capza2, Rtn4 i Anxa2	1.08e-08
GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	(27) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Map1b, Actbl2, Capzb, Tubb6, Hspa8, Capza2, Hsbp1, Rcn2, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Dynll1, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Anxa2 i Calm1	1.08e-08
GO:0097481	neuronal postsynaptic density	(7) Map2, Nefm, Camk2b, Camk2a, Map1b i Camk2g	5.04e-08
GO:0005856	cytoskeleton	(19) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Map1b, Actbl2, Capzb, Tubb6, Capza2, Hsbp1, Ywhae, Dynll1, Myl6, Dynll2 i Calm1	1.76e-07
GO:0070062	extracellular exosome	(22) Actb, Tubb4a, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, whag, Erh, Prdx3, Hspa8, Capza2, Grn, Ywhae, Ybx1, Dynll1, Myl6, Banf1, Rplp2, C1qbp, Itih3, Rtn4, Eif3h, Anxa2, Hp i Hpcal1	2.73e-07
GO:0044430	cytoskeletal part	(16) Map2, Nefl, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Map1b, Capzb, Tubb6, Capza2, Ywhae, Dynll1, Myl6, Dynll2 i Calm1	2.79e-07
GO:0014069	postsynaptic density	(8) Map2, Nefm, Camk2b, Camk2a, Ywhaz, Map1b i Camk2g	6.53e-07
GO:0031982	vesicle	(24) Actb, Tubb4a, Tuba1c, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Grn, Ywhae, Ybx1, Dynll1, Myl6, Banf1, Rplp2, Itih3, Rtn4, Eif3h, Anxa2 i Hp	6.53e-07
GO:0005576	extracellular region	(26) Actb, Tubb4a, Ina, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Grn, Ywhae, Ybx1, Dynll1, Myl6, Banf1, Rplp2, Itih3, Rtn4, C1qbp, Eif3h, Anxa2 i Hp	8.98e-07
GO:0044421	extracellular region part	(24) Actb, Tubb4a, Ina, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Grn, Ywhae, Ybx1, Dynll1, Myl6, Banf1, Rplp2, Itih3, Rtn4, Eif3h, Anxa2 i Hp	1.25e-06
GO:0031988	membrane-bounded vesicle	(23) Actb, Tubb4a, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Grn, Ywhae, Ybx1, Dynll1, Myl6, Banf1, Rplp2, Itih3, Rtn4, Eif3h, Anxa2 i Hp	1.54e-06
GO:0097458	neuron part	(14) Map2, Nefm, Tubb4a, Camk2b, Camk2ba, Map1b, Camk2d, Camk2g, Ywhae, Dynll2, Rtn4, Ybx1, Atxn10 i Calm1	2.13e-06
GO:0044463	cell projection part	(12) Map2, Nefm, Nefl, Tubb4a, Camk2b, Camk2b, Map1b, Camk2b, Camk2g, Dynll2, Hspa8, Rtn4, i Calm1	7.78e-06
GO:0005737	cytoplasm	(37) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Actc1, Camk2b, Camk2a, Map1b, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Hspa8, Capza2, Calu, Grn, Rcn2, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Dynll1, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4, Eif3h, Calm1, Fastkd2, Hp, Rab33a, Ube3b	2.01e-05
GO:0098794	postsynapse	(8) Map2, Nefm, Camk2b, Camk2a, Ywhaz, Map1b i Camk2g	4.12e-05
GO:0045202	synapse	(10) Map2, Nefm, Camk2b, Camk2a, Ywhaz, Map1b, Hspa8, Camk2d i Camk2g	5.11e-05
GO:0043234	protein complex	(22) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Map1b, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Prdx3, Capza2, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Myl6, Dynll2, Eif3h, Anxa2 i Hp	5.7e-05
GO:0005883	neurofilament	(3) Nefl, Nefm i Ina	5.78e-05
GO:0044456	synapse part	(9) Map2, Nefm, Camk2b, Camk2a, Ywhaz, Map1b, Hspa8 i Camk2g	6.5e-05
GO:0044444	cytoplasmic part	(29) Actb, Nefm, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Map1b, Capzb, Ywhaz, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Hspa8, Capza2, Calu, Grn, Rcn2,	8.15e-05

		Ywhae, Ybx1, Eef1d , Dynll1, Rplp2, Rtn4, Eif3h, Calm1, Fastkd2, Hp i Rab33a	
GO:0032991	<b>macromolecular complex</b>	(23) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Map1b, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Capza2, Ywhae, Prdx3, Ybx1, Eef1d , Dynll2, Rplp2, Eef1b, Eif3h, Anxa2, Fastkd2 i Hp	0.00017
GO:0042470	<b>melanosome</b>	(5) Calu, Hspa8, Ywhae, Ywhaz i Anxa2	0.00017
GO:0044446	<b>intracellular organelle part</b>	(29) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Map1b, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Hspa8, Capza2, Calu, Rcn2, Ybx1, Eef1d, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4, Anxa2 i Calm1	0.000218
GO:0005875	<b>microtubule associated complex</b>	(5) Map2, Ywhae, Map1b, Dynll2 i Dynll1	0.00022
GO:0005853	<b>eukaryotic translation elongation factor 1 complex</b>	(2) Eef1d i Eef1b	0.000243
GO:0016529	<b>sarcoplasmic reticulum</b>	(4) Calu, Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.000302
GO:0005829	<b>cytosol</b>	(14) Nefl, Actb, Camk2b, Map1b, Ywhaz, Ywhag, Hspa8, Ywhae, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Atxn10, Anxa2 i Calm1	0.00031
GO:0043005	<b>neuron projection</b>	(10) Map2, Nefm, Tubb4a, Camk2b, Map1b, Hspa8, Atxn10, Ybx1, Rtn4 i Calm1	0.000312
GO:0005874	<b>microtubule</b>	(7) Map2, Tuba1c, Map1b, Tubb4a, Tubb6, Dynll2 i Dynll1	0.000327
GO:0016528	<b>sarcoplasm</b>	(4) Calu, Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.000348
GO:0043229	<b>intracellular organelle</b>	(36) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Map1b, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Hsbp1, Grn, Rcn2, Eef1b, Hbb-b1, Ybx1, Eef1d , Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4, Fastkd2, Hp i Rab33a	0.000413
GO:1990124	<b>messenger ribonucleoprotein complex</b>	(2) Hspa8 i Ybx1	0.000579
GO:0043227	<b>membrane-bounded organelle</b>	(36) Map2, Actb, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Hsbp1, Grn, Rcn2, Eef1b, Ybx1, Eef1d , Itih3, Fastkd2, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4, Fastkd2, Eif3h, Rab33a	0.000788
GO:0015630	<b>microtubule cytoskeleton</b>	(10) Map2, Camk2b, Ywhae, Tuba1c, Map1b, Tubb4a, Tubb6, Dynll2, Dynll1 i Calm1	0.00112
GO:0043226	<b>organelle</b>	(37) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Map1b, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Capza2, Calu, Hsbp1, Grn, Rcn2, Eef1b, Hbb-b1, Ybx1, Eef1d , Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Itih3, Rtn4, Fastkd2, Hp i Rab33a	0.00112
GO:0033017	<b>sarcoplasmic reticulum membrane</b>	(3) Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.00156
GO:0072562	<b>blood microparticle</b>	(4) Hspa8, Ywhaz, Actb i Hp	0.00156
GO:0030054	<b>cell junction</b>	(10) Actb, Map1b, Capzb, Camk2a, Camk2d, Hspa8, Ywhaz, Ywhae, Ywhag	0.00243
GO:0030424	<b>axon</b>	(6) Nefl, Nefm, Tubb4a, Camk2d, Ywhae i Hspa8	0.0033
GO:0008290	<b>F-actin capping protein complex</b>	(2) Capzb i Capza2	0.00334
GO:0005925	<b>focal adhesion</b>	(6) Actb, Hspa8, Ywhaz, Ywhae, Ywhag i Rplp2	0.00377
GO:0036477	<b>somatodendritic compartment</b>	(7) Map2, Map1b, Tubb4a, Camk2d, Hspa8, Ybx1 i Atxn10	0.00618
GO:0016020	<b>membrane</b>	(28) Map2, Actb, Tubb4a, Ina, Camk2b, Camk2a, Map1b, Capzb, Ywhaz, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Erh, Hspa8, Capza2, Calu, Ywhae, Ybx1, Dynll1, Myl6, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4, Atxn10, Eif3h, Anxa2, Calm1 i Rab33a	0.00707
GO:0044297	<b>cell body</b>	(6) Map2, Actc1, Hspa8, Atxn10, Camk2d i Tubb4a	0.00735
GO:0030863	<b>cortical cytoskeleton</b>	(3) Actb, Capzb i Capza2	0.0103

GO:0005615	<b>extracellular space</b>	(9) Grn, Hspa8, Ina, Ywhaz, Actb, Actbl2, Hp, Atnx10 i Anxa2	0.0152
GO:0044424	<b>intracellular part</b>	(35) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Map1b, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3,Eif3h, Hspa8, Capza2, Calu, Hsbp1, Grn, Rcn2, Ybx1, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4, Fastkd2, Hp, Rab33a i Ube3b	0.0164
GO:0005938	<b>cell cortex</b>	(4) Actb, Capzb, Capza2 i Anxa2	0.0231
GO:0043025	<b>neuronal cell body</b>	(5) Map2, Camk2d, Hspa8, Tubb4a i Atnx10	0.0263
GO:0005622	<b>intracellular</b>	(35) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Map1b, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3,Eif3h, Hspa8, Capza2, Calu, Hsbp1, Grn, Rcn2, Ybx1, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4, Fastkd2, Hp, Rab33a i Ube3b	0.0264
GO:0005903	<b>brush border</b>	(3) Capzb, capza2 i Myl6	0.0304
GO:0043231	<b>intracellular membrane-bounded organelle</b>	(30) Map2, Actb, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Camk2b, Camk2a, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Prdx3, Hspa8, Calu, Hsbp1, Grn, Rcn2, Eef1b, Ywhae, Ybx1, Eef1d, Banf1, Dynll2, C1qbp, Rtn4, Calm1, Fastkd2, Hp i Rab33a	0.0323
GO:0044464	<b>cell part</b>	(37) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Actc1, Camk2b, Camk2a, Map1b, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Erh, Capza2, Calu, Hsbp1, Grn, Rcn2, Ybx1, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4,Eif3h, Anxa2, Fastkd2, Hp, Rab33a i Ube3b	0.0339
GO:0005623	<b>cell</b>	(37) Map2, Nefl, Actb, Nefm, Tubb4a, Ina, Tuba1c, Actc1, Camk2b, Camk2a, Map1b, Actbl2, Capzb, Ywhaz, Tubb6, Camk2d, Camk2g, Ywhag, Erh, Capza2, Calu, Hsbp1, Grn, Rcn2, Ybx1, Myl6, Banf1, Dynll2, Rplp2, C1qbp, Rtn4,Eif3h, Anxa2, Fastkd2, Hp, Rab33a i Ube3b	0.0358

**Taula A.5. Llistat total dels components cel·lulars enriquits en l'anàlisi d'ontologies del gen.**

Components cel·lulars detectats amb un enriquiment en l'anàlisi de GO. L'anàlisi s'ha realitzat amb les proteïnes de la taula R.5.1. Cada component té associat un nombre de gens, entre parèntesi, i un llistat amb les abreviacions dels gens. Programa de "String consortium" versió 10.0.



**Taula A.6 Llistat de les vies implicades en KEGGS amb la llista de proteïnes detectades**

KEGGs	pathway description	genes	false discovery rate
04114	Oocyte meiosis	(7) Camk2b, Camk2d, Camk2g, Calm, Ywhae, Ywhag i Ywhaz	8.41e-07
04971	Gastric acid secretion	(5) Actb, Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	6.56e-05
04921	Oxytocin signaling pathway	(6) Actb, Camk2b, Camk2d, Camk2g, Calm i Myl6	0.000105
04722	Neurotrophin signaling pathway	(5) Ywhae, Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00042
04720	Long-term potentiation	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.000431
05031	Amphetamine addiction	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.000431
05214	Glioma	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.000431
04261	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	(5) Actc1, Camk2b, Camk2d, Camk2g, Calm	0.000521
04145	Phagosome	(5) Tuba1c, Tubb4a, Actb, Tubb6 i Tuba1a	0.000877
04540	Gap junction	(4) Tuba1c, Tubb4a, Tubb6 i Tuba1a	0.001
04912	GnRH signaling pathway	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.001
04713	Circadian entrainment	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00125
04916	Melanogenesis	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00131
04750	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00271
04728	Dopaminergic synapse	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00306
04390	Hippo signaling pathway	(4) Ywhae, Ywhag, Yhaz i Actb	0.00579
05152	Tuberculosis	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00898
04020	Calcium signaling pathway	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Calm	0.00987
04012	ErbB signaling pathway	(3) Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.012
04911	Insulin secretion	(3) Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.012
05169	Epstein-Barr virus infection	(4) Hspa8, Ywhae, Ywhag i Ywhaz	0.0128
05205	Proteoglycans in cancer	(4) Camk2b, Camk2d, Camk2g i Actb	0.0178
04066	HIF-1 signaling pathway	(3) Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.0211
04725	Cholinergic synapse	(3) Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.0218
04110	Cell cycle	(3) Ywhae, Ywhag i Ywhaz	0.0275
04310	Wnt signaling pathway	(3) Camk2b, Camk2d i Camk2g	0.0399
04962	Vasopressin-regulated water reabsorption	(2) Dynl1 i Dynl2	0.0447

**Taula A.6. Llista total de les vies enriquides segons l'anàlisi de l'Enciclopèdia de gens i genomes de Kyoto (KEGGs).**

Les vies detectades amb un enriquiment en l'anàlisi per KEGGs. L'anàlisi s'ha realitzat amb les proteïnes de la taula R.5.1. Cada via té associada un nombre de gens i un llistat amb les abreviacions dels gens. Programa de "String consortium" versió 10.0..



