



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina



Institut de Neurociències
Universitat Autònoma de Barcelona

Regulació del creixement axonal per Presenilina-1/ γ -secretasa: paper del receptor EphA3

Sergi Marco Martín

TESI DOCTORAL

Bellaterra 2013



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

Institut de Neurociències
Universitat Autònoma de Barcelona

Regulació del creixement axonal per Presenilina-1/ γ -secretasa: paper del receptor EphA3

Memòria de tesi doctoral presentada per *Sergi Marco Martín* per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Treball realitzat a la Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Medicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, i en l'Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Doctor Carlos Saura Antolín.

El treball realitzat en aquesta tesi doctoral ha estat finançat pels projectes de recerca del Ministerio de Economía y Competitividad "Transcriptome analysis of Alzheimer's disease transgenic mice" (SAF2010-20925), pel Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), i la Fundació Marató TV3 – 050710 (Regulació de les vies de transducció de senyals dependents de les presenilines en càncer de pell).

Bellaterra, 26 de Juliol del 2013

Doctorand

Director de tesi

Sergi Marco Martín

Dr. Carlos Saura Antolín

I.	ÍNDEX	1
II.	ABREVIATURES	5
III.	RESUM	8
IV.	INTRODUCCIÓ	11
1.	L'AXÓ	13
1.1	Fases del creixement axonal	15
1.2	Vies de senyalització per al creixement i guia axonal: receptors	18
1.3	Les RhoGTPases en el creixement axonal	21
2.	ELS RECEPTORS D'EFRINES EPH	24
2.1	La família Eph-ephrin	24
2.2	Senyalització anterògrada i retrògrada dels complexos Eph-ephrin	25
2.3	Senyalització Eph-ephrin durant l'elongació i guia axonal	28
2.4	Funció de Eph-ephrin en les sinapsis	29
2.5	Implicació de la senyalització Eph-ephrin en patogènesi	32
3.	LES PRESENILINES I EL COMPLEX γ -SECRETASA	35
3.1	Estructura i localització de les presenilines	35
3.2	Funcions biològiques de les presenilines	36
3.2.1	El complex γ -secretasa	36
3.2.2	Mecanismes de proteòlisi per PS/ γ -secretasa	37
3.2.3	Processament dels ectodominis dels substrats de γ -secretasa	38
3.2.4	Vies de senyalització regulades per l'activitat PS/ γ -secretasa	40
3.2.5	Paper de la presenilina-1 en el desenvolupament del CNS	42
3.3	Paper de PS/ γ -secretasa en la malaltia d'Alzheimer i altres patologies	43
V.	OBJECTIUS	49
VI.	MATERIALS I MÈTODES	53
1.	CULTIU CEL·LULAR	53
1.1	Línies cel·lulars	53
1.1.1	Tipus de línies cel·lulars	53
1.1.2	Material de línies cel·lulars	53
1.1.3	Manteniment de línies cel·lulars	53
1.1.4	Transfecció de línies cel·lulars	54
1.1.5	Tractaments farmacològics	54
1.2	Cultiu primari de neurones	54
1.2.1	Material de cultius primaris	54

1.2.2 Cultiu primari de neurones PS1 ^{-/-}	55
1.2.3 Tractaments farmacològics	56
1.2.4 Transfecció de neurones	56
1.2.5 Infecció de neurones amb lentivirus	57
1.2.6 Tractament farmacològic amb ephrin-A5-Fc	57
2. MÈTODES BIOQUÍMICS	57
2.1 Immunoprecipitació i coimmunoprecipitació	57
2.2 Electroforesi i Western blotting	58
2.2.1 Lisat cel·lular i determinació de proteïna	58
2.2.2 Electroforesi SDS-PAGE i transferència de proteïna	59
2.2.3 Detecció de proteïnes per Western blotting	59
2.3 Assaig d'activitat RhoA	61
2.4 Fraccionament subcel·lular	61
2.5 Assaig d'activitat γ -secretasa	61
2.6 Anàlisi per espectrometria de masses	62
3. MÈTODES DE BIOLOGIA MOLECULAR	62
3.1 Amplificació i purificació de DNA	62
3.2 Purificació de DNA genòmic i genotipatge dels ratolins PS1 ^{-/-}	64
3.3 Generació de RNA d'interferència <i>short-hairpin</i>	65
3.4 Clonatge	68
3.4.1 Plàsmids PS1	68
3.4.2 Plàsmids d'EphA3. Introducció de la seqüència HA en constructes d'EphA3	68
3.4.3 Clonatge del domini intracel·lular d'EphA3	70
4. MÈTODES DE BIOLOGIA CEL·LULAR	73
4.1 Tècniques d'immunofluorescència de cèl·lules en cultiu	73
4.1.1 Anàlisi del creixement axonal	74
4.1.2 Anàlisi de col·localització	75
4.2 Tècniques d'immunohistoquímica amb fluorescència	75
4.2.1 Obtenció i fixació de les mostres biològiques	75
4.2.2 Immunohistoquímica amb fluorescència	75
5. ANÀLISI ESTADÍSTIC	71
VII. RESULTATS	81
CAPÍTOL I: PS1 REGULA EL CREIXEMENT AXONAL	
1. Alteracions del creixement axonal en ratolins PS1 ^{-/-}	81
2. Alteració del creixement axonal en neurones hipocampals PS1 ^{-/-}	85

3. PS1 regula el creixement axonal a través de l'activitat γ -secretasa	86
4. Efecte de les mutacions en PS1 associades a Alzheimer familiar en el creixement axonal	88
5. PS1 regula la formació de sinapsis a través de l'activitat γ -secretasa	89
 CAPÍTOL II: PS1 REGULA EL CREIXEMENT AXONAL A TRAVÉS DEL RECEPTOR EPHA3	
1. PS1 i EphA3 col·localitzen i interaccionen en els axons de neurones en cultiu	93
2. PS1 regula el processament d'EphA3	95
2.1 PS1/ γ -secretasa regula el processament d'EphA3 per PS en neurones hipocampals, HEK293T i fibroblasts	95
2.2 El complex PS1/ γ -secretasa genera un domini d'EphA3 intracel·lular	97
3. El domini C-terminal d'EphA3 es localitza en el nucli	100
4. EphA3 ICD regula el creixement axonal	101
4.1 La inactivació d'EphA3 redueix el creixement axonal	101
4.2 L'EphA3 ICD reverteix el creixement axonal en neurones deficientes en PS/ γ -secretasa	104
4.3 EphA3 ICD reverteix l'efecte de l'inactivació d'EphA3 sobre el creixement axonal	105
4.4 Efecte de mutacions en EphA3 sobre el processament i el creixement axonal	106
 CAPÍTOL III: EPHA3 ICD REGULA EL CREIXEMENT AXONAL A TRAVÉS DE LA VIA DE RHOA	
1. PS/ γ -secretasa inhibeix l'activitat RhoA en neurones	111
2. La inhibició de ROCK-1, reverteix el creixement axonal en neurones hipocampals deficientes en PS/ γ -secretasa	112
3. La inhibició genètica de RhoA reverteix el creixement axonal en neurones hipocampals deficientes en PS/ γ -secretasa	114
4. Efecte de Rac1 i Cdc42 en el creixement axonal regulat per PS/ γ -secretasa	115
5. EphA3 ICD inhibeix l'activitat RhoA	117
6. El fragment EphA3 ICD interacciona amb les miosines	118
 VIII. DISCUSSIÓ	123
PS1 regula el creixement axonal durant el desenvolupament embrionari	123
L'activitat PS/ γ -secretasa és necessària pel creixement axonal	125
PS1 localitza i interacciona amb el receptor d'efrina EphA3	126
El receptor d'efrina EphA3 és un substrat de PS/ γ -secretasa	127
El processament d'EphA3 per PS/ γ -secretasa regula el creixement axonal	128
PS1/ γ -secretasa afavoreix el creixement axonal a través de RhoA	129
EphA3 ICD interacciona amb la miosina-IIA i la miosina-IB	131
Possible interrelació de PS1 i EphA3 en neurodegeneració i càncer	133
 IX. CONCLUSIONS	137

X. BIBLIOGRAFIA

141

AD - Malaltia d'Alzheimer	GEF - GTP exchange factor
ADAM - A desintegrin and metalloprotease	GFP - <i>Green fluorescent protein</i>
AICD - APP intracellular domain	GPI - Glucosilfosfatidilinositol
AMPA - Àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropionic	GTP - Guanina trifosfat
APP - Amyloid precursor protein	HA - epítip de l'hemaglutinina
Arp2/3 - Actin-related proteins 2/3	ICD - Intracel·lular domain
Aβ - Pèptid β -amiloide	iCLIP - Intramembranous cleaving proteins
BACE - β -site APP cleaving enzyme	IGF - Insulin-like growth factor
BDNF - Brain-derived growth factor	LPA - Àcid oleoil-L- α -lisofosfatídic
BSA - Albúmina sèrica bovina	LTP - Long-term potentiation
CA - Constitutivament actiu	MEF - Fibroblasts embrionaris immortalitzats
CAM - Cell adhesion molecule	MLCK - Myosin light chain kinase
CNS - Sistema nerviós central	MMP - Matrix metalloprotease
CTF - Fragment C-terminal	NCAM - Neural cell adhesion molecule
DAPT - <i>N</i> -[(3,5-Difluorofenil)acetil]-L-al-anil-2-fenil]glicina-1,1-dimetiletíl ester	NFT - Neurofibrillary tangle
DCC - Deleted in colorectal cancer	NGF - Nerve growth factor
DIV - Dies <i>in vitro</i>	NGS - Sèrum normal de cabra
DMSO - Dimetilsulfòxid	NICD - Notch intracel·lular domain
DN - Dominant negatiu	NTP - Nucleòtid trifosfat
DNA - Àcid desoxiribonucleic	Pak - p21-activated kinase
EGFP - Enhanced green fluorescent protein	PAR - Partitioning-defective protein
ELISA - Enzyme-linked immunoabsorbent assay	PBS - Tampó salí fosfatat
EphA3 CTF - Fragment C-terminal del receptor EphA3	PCR - Reacció en cadena de la polimerasa
EphA3 ICD - Domini intracel·lular del receptor EphA3	PHF - Paired helical filament
FAD - Familial Alzheimer's disease	PI3K - Phosphoinositide 3-kinase
FN3 - Repeticions de tipus 3 de fibronectina	PIP₃ - Fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfat
GAP - GTPase activating protein	PS - Presenilines
GDP - Guanina difosfat	PS1 - Presenilina-1
	PS1^{-/-} - Cèl·lules deficients per presenilina-1
	PS1^{+/+} - Cèl·lules amb expressió de presenilina-1

PS2 - Presenilina-2

RNA - Àcid ribonucleic

ROCK - Rho kinase

SAM - Motiu estèril alfa

sAPP - Soluble APP

shRNA - *short hairpin RNA*

TACE - tumor necrosis factor- α converting enzyme

TBS - Tampó salí amb tris

TMD - Domini transmembrana

WT - Wild type

Δ LBD - delecio del domini d'unió a lligand

Δ PDZ - delecio del motiu d'unió a PDZ

RESUM

Mutacions en els gens de les presenilines (PS: PS1 i PS2), el component catalític del complex γ -secretasa, són la principal causa d'Alzheimer familiar hereditari (FAD). Evidències recents demostren que mutacions associades a FAD produeixen una reducció del processament per PS/ γ -secretasa de diversos substrats, suggerint un mecanisme de pèrdua de funció d'aquestes mutacions. De fet, la inactivació genètica d'ambdues PS en el cervell adult causa dèficits en la plasticitat sinàptica i memòria, i neurodegeneració. Durant el desenvolupament embrionari, la inactivació de PS1 indueix canvis en la neurogènesi i la mort prematura probablement degut, almenys en part, a alteracions en la via de senyalització de Notch. Malgrat això, el paper de la PS1 i/o l'activitat γ -secretasa i els mecanismes moleculars regulats per aquests durant els processos de diferenciació neuronal, tals com el creixement axonal i dendrític i la formació de sinapsis, en gran part es desconeixen.

Un dels principals esdeveniments durant la maduració neuronal és el creixement de l'axó, un procés necessari per establir connexions sinàptiques adequades pel funcionament dels circuits neuronals. La família de proteïnes Rho GTPases regulen la polarització neuronal i el creixement de l'axó. Per altra banda, els receptors tirosina quinasa d'èfrina (Eph) regulen el creixement i la guia axonal durant la maduració neuronal. L'activació dels receptors Eph indueix el col·lapse del con de creixement i la retracció axonal a través de l'activitat RhoA. L'objectiu d'aquesta tesi doctoral ha sigut investigar el paper de PS1/ γ -secretasa durant el creixement axonal, així com els mecanismes moleculars implicats en aquesta regulació. Els resultats obtinguts demostren que la inactivació genètica de PS1 en ratolins indueix una reducció del creixement axonal en la regió ventricular i en l'hipocamp. En el mateix sentit, la inactivació genètica o farmacològica de l'activitat PS1/ γ -secretasa indueix una reducció significativa del creixement axonal en neurones hipocampals en cultiu. De fet, la inactivació de PS/ γ -secretasa incrementa l'activitat de RhoA GTPasa causant defectes en l'elongació de l'axó, un efecte que és revertit a l'inhibir RhoA o la seva proteïna efectora ROCK. A més, en aquest treball descrivim per primera vegada que PS1 col·localitza amb el receptor EphA3 en els axons de neurones hipocampals, i que PS1/ γ -secretasa regula el processament d'EphA3 de forma constitutiva i independent de lligand, essent aquest processament necessari per al creixement axonal. A més, demostrem que la generació del fragment intracel·lular EphA3 ICD per PS/ γ -secretasa, és clau per al creixement axonal, de manera que un mutant de EphA3 que perd la capacitat de ser proteolitzat no reverteix els defectes del creixement axonal causats per la inactivació de PS1. Per contra, l'expressió d'EphA3 ICD rescata el creixement axonal en neurones hipocampals deficientes en PS/ γ -secretasa o EphA3. A més, l'expressió d'EphA3 ICD disminueix l'activitat RhoA GTPasa, a la vegada que interacciona amb les miosines Ib i IIa, proteïnes que són clau en la regulació de l'organització del citoesquelet axonal en el con de creixement. Per tant, els nostres resultats demostren que la PS1/ γ -secretasa juga un paper essencial durant creixement axonal en neurones hipocampals a través de la regulació de les vies de senyalització d'EphA3 i RhoA.

INTRODUCCIÓ

1. L'AXÓ

L'axó és la projecció que desenvolupen les neurones des del soma fins a la sinapsi, format per l'extensió del citoplasma neuronal, anomenat axoplasma, i recobert per la membrana citoplasmàtica, anomenada axolema (Waxman et al., 1995). La sinapsi és el punt on es produeix la comunicació amb el soma o l'arbre dendrític d'una altra neurona per tal de conduir una senyal codificada com a impuls elèctric o químic. La conducció elèctrica de la senyal a través d'un axó és unidireccional i no-decreixent (Debanne et al.). Més enllà de la transmissió de potencials d'acció, els axons també tenen altres funcions com són el transport de proteïnes o de vesícules necessàries per al correcte funcionament de les sinapsis de forma bidireccional, des del soma o cap al soma (Schwartz, 1979; Chevalier-Larsen and Holzbaaur, 2006).

En comparació al soma, els axons contenen un nombre menor d'orgànuls, essent absents entre ells l'aparell de Golgi o el reticle endoplasmàtic. L'estructura tubular dels axons es mantinguda gràcies a un citoesquelet que a diferència d'altres estructures està compost majoritàriament per neurofilaments. Els neurofilaments són filaments intermedis de 10 nm de diàmetre que tenen una funció bàsicament estructural degut a la seva disposició paral·lela a la prolongació de l'axó (Carpenter and Ip, 1996; Hoffman et al.). De fet, els neurofilaments són els encarregats de determinar el diàmetre de l'axó. Els neurofilaments estan compostos per tres subunitats principals: les subunitats lleugeres, les intermèdies i les pesades (Lee and Cleveland, 1994). Juntament amb aquestes subunitats principals també s'hi troben les subunitats d' α -internexina, present en les neurones madures (Yuan et al., 2006), i la subunitat nestina, present només durant estadis inicials de la maduració neuronal (Lendahl et al., 1990).

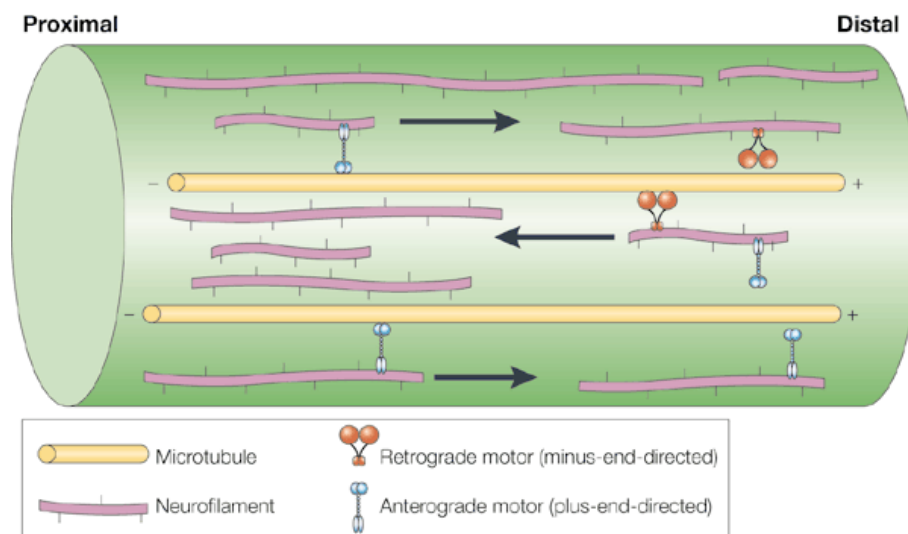


Figura I1 - Estructura de l'axó: Neurofilaments i microtúbuls.

Altres membres del citoesquelet axonal són els microtúbuls o el citoesquelet d'actina. A diferència dels neurofilaments, els microtúbuls tenen un diàmetre major (24 nm) i la seva estructura helicoidal genera un lumen central. La seva estructura paral·lela a la longitud de l'axó conté ramificacions laterals, el qual no succeeix en les estructures formades per neurofilaments (Conde and Cáceres, 2009). La funció principal dels microtúbuls és la dels transport axonal anterògrad i retrògrad, tan d'òrgans com les mitocòndries com de vesícules i proteïnes (Guzik and Goldstein, 2004).

En l'extrem més distal de l'axó en desenvolupament es genera el con de creixement, una estructura diferent a les anteriors degut a la seva morfologia estrellada amb un alt nivell de dinamisme. El con de creixement respon als estímuls interns i externs modificant la seva forma i mida de manera constant, estenent o retraient protrusions de la membrana citoplasmàtica. Aquestes protrusions poden ser en forma de dit, les quals s'anomenen fil·lopodia, o en forma de fulla arrodonida, anomenats lamelipodia, i es troben presents en la part més perifèrica del con de creixement. La zona central del con de creixement, per contra, presenta un dinamisme menor en comparació a la perifèria tot i que igualment significatiu. El dinamisme de la part central està més relacionat amb el transport d'òrgans i vesícules provinents de la regió tubular de l'axó (Lowery and Vactor, 2009). El citoesquelet del con de creixement està compost principalment per filaments d'actina, el dinamisme dels quals és responsable de l'exploració de l'entorn de l'axó per tal de permetre, en gran part, el creixement de l'axó i el seu direccionament (Dent et al., 2011).

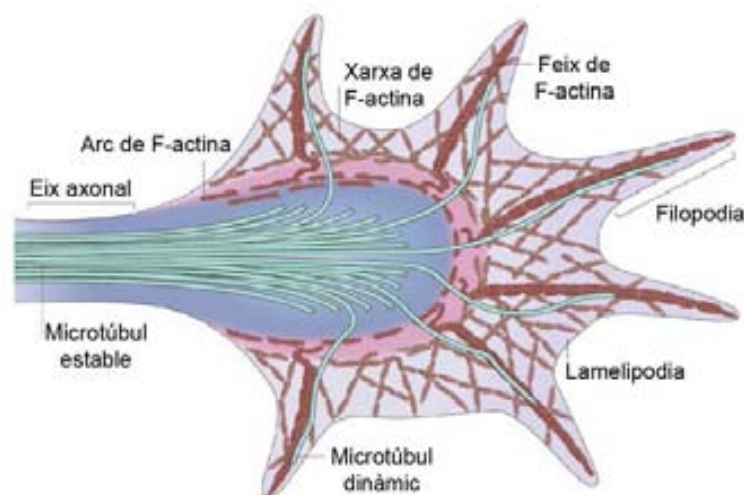


Figura 12 - Estructura del con de creixement: citoesquelet d'actina (regió perifèrica) i citoesquelet de microtúbuls (regió central)

1.1 Fases del creixement axonal

Neuritogènesi

El primer pas de la diferenciació neuronal que durà a la generació de neurites i per tant l'obtenció d'un axó, és el trencament de l'esfera neuronal. Aquest procés consisteix en la reorganització de la membrana neuronal per tal d'obtenir protrusions que poden desembocar finalment en la generació d'una neurita. Així doncs, l'obtenció d'una morfologia neuronal depèn de la combinació de forces intrínseques i extrínseques a la neurona.

La matriu extracel·lular és una estructura complexa de macromolècules que serveix com a bastida per l'adhesió cel·lular, la migració i la morfogènesi. L'orientació i morfologia de les neurites immadures està regulada per un grup de molècules promotores presents en la matriu extracel·lular. Entre elles hi trobem les glicoproteïnes adhesives: laminina, tenascina i fibronectina; i els glicosaminoglicans: hialuronat i heparan sulfat, les quals tenen una alta expressió en el cervell (Bovolenta and Fernaud-Espinosa, 2000; Raulo et al.). Les molècules de la matriu són reconegudes per les neurones gràcies a receptors de membrana com les integrines, les CAM (*cell adhesion molecule*) (Hansen et al., 2008) o CD44 (Condic and Letourneau, 1997; Ponta et al., 2003). La neuritogènesi és produïda en el moment en què aquestes molècules de la matriu extracel·lular activen els receptors de la membrana citoplasmàtica, desencadenant una cascada de senyalització en la neurona immadura. A part de les molècules de la matriu extracel·lular, les neurones també regulen la neuritogènesi a través de molècules solubles. Entre aquestes hi trobem els factors tròfics FGF2, FGF7, VEGF, IGF o les neurotrofines (Williams et al., 1994; Tucker et al., 2001; Jin et al., 2006).

Durant l'etapa inicial de la neuritogènesi el citoesquelet d'actina genera estructures anomenades fil·lopodia, les quals estan ancorades en un extrem a la matriu extracel·lular i en l'altra a receptors de membrana com les integrines. Degut a un acúmulo d'estímuls externs en la matriu extracel·lular es produeix una acumulació de receptors en la membrana neuronal que induïx la formació de microdominis. Els microdominis de membrana potencien la formació de neurites a través de l'augment de Ca^{2+} intracel·lular, i per tant, activant les proteïnes de citoesquelet dependents de Ca^{2+} (Gomez et al., 2001; Spitzer, 2002). Entre aquest tipus de vies de senyalització hi trobem la via induïda per la interacció entre NCAM i els receptors de FGF, els quals un cop activats són capaços d'activar la fosfolipasa-C γ induïnt un augment de Ca^{2+} intracel·lular (Hansen et al., 2008). L'augment de Ca^{2+} produeix l'activació de les proteïnes reguladores del citoesquelet CaMKII i GAP-43, que acaba induïnt la formació de neurites.

Polarització neuronal

La formació de neurites equivalents en les neurones finalitza en el moment en què es produeix el procés de polarització. La polarització neuronal és el mecanisme pel qual una de les neurites es converteix en axó mentre que la resta es converteixen en dendrites (Dotti et al., 1988). Aquest mecanisme també pot ser considerat com una neuritogènesi asimètrica, la qual es regula per molècules senyalitzadores i el tràfic de proteïnes. El balanç entre els estímuls positius i negatius acaben concloent en la formació d'un únic axó.

Els morfògens són un conjunt de factors de senyalització que controlen l'extensió i retracció neurítica, difonent entre les neurites i regulant el comportament dels filaments d'actina, els microtúbuls i els transport vesicular (Andersen and Bi, 2000). L'extensió neurítica es produeix seqüencialment per l'augment de la membrana plasmàtica i per tant és dependent del reclutament de vesícules; l'augment de la concentració localitzada de molècules senyalitzadores com la fosfatidilinositol 3-quinasa (Shi et al., 2003; Amato et al., 2011), les RhoGTPases i els seus receptors, i l'augment del dinamisme dels filaments d'actina i la potenciació de la formació de microtúbuls (Wiggin et al., 2005). Immediatament després d'un creixement lleu, es desencadena la reacció contrària, destruint els microtúbuls, disminuint el dinamisme dels filaments d'actina i augmentant la endocitosi. Així doncs, quan es trenca l'equilibri entre el creixement i el decreixement degut a un estímul positiu, s'inicia el procés de polarització de manera continua i autoactivada.

Existeixen dos tipus de condicionants que permeten la selecció d'una neurita per a que es converteixi en axó, els factors extrínsecs i els intrínsecs. En el grup dels extrínsecs trobem diversos estímuls positius en forma de factors extracel·lulars secretats com les netrines, WNT o els factors tròfics NGF i BDNF, o la neurotrofina NT3 (Labelle and Leclerc, 2000; Prasad and Clark, 2006). També hi ha factors extracel·lulars que formen part de la matriu extracel·lular com la laminina o la molècula d'adhesió cel·lular neurona-glia (NgCAM) que són capaços d'induir la determinació axonal d'una neurita (Da Silva et al., 2005).

Per altra banda es consideren factors intrínsecs aquells que per la seva localització i activació en la neurona afavoreixen una neurita respecte la resta per convertir-se en axó. El mecanisme de convergència de diverses proteïnes senyalitzadores en un espai concret està regit pel proteosoma (Yan et al., 2006). La degradació selectiva de diverses proteïnes indueix a una distribució asimètrica en les diferents neurites de diferents vies de senyalització. Un exemple és el fet que en l'extrem de l'axó, en les primeres etapes de la polarització neuronal, es produeix l'activació de Ras, desencadenant l'activació de primer PI3K i a continuació PDK1 i Akt, induint així la inhibició de GSK3 β (Jiang et al., 2005). Aquesta inhibició de GSK3 β s'ha demostrat necessària per a l'especificació neuronal. La via de senyalització de PI3K també regula la localització d'altres complexos de proteïnes com és el cas del complex PAR (PAR3-PAR6-aPKC) (Shi et al., 2003), el qual es concentra en l'axó durant les primeres etapes de polarització provinent dels altres processos menors.

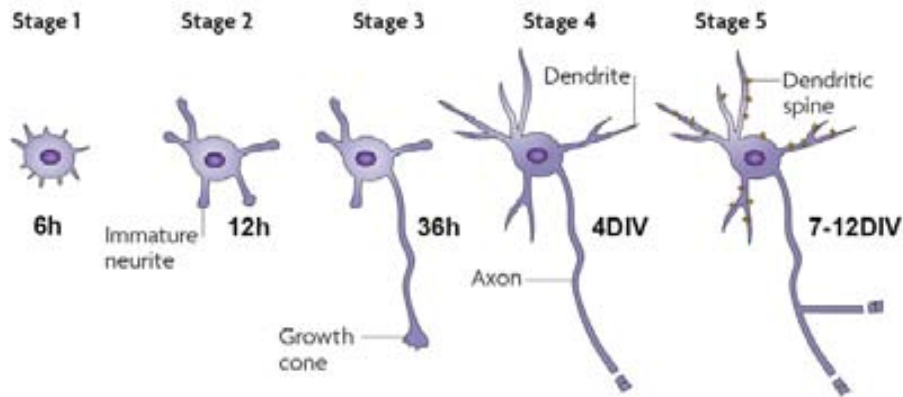


Figura I3 - Maduració neuronal: fases del creixement axonal.

Creixement axonal

Després de l'establiment de la polaritat neuronal, l'axó s'estén considerablement en comparació a les dendrites. Per a poder mantenir aquest increment del creixement és necessària la coordinació dels diversos factors com són la producció de membrana plasmàtica, la síntesi de proteïnes citosòliques i finalment l'assemblatge i el transport de les proteïnes estructurals fins a ser inserides en el lloc correcte.

Tan les proteïnes secretades com els glicolípidis es sintetitzen en el soma ja que és allí on es troben el reticle endoplasmàtic rugós i l'aparell de Golgi. Un cop sintetitzats s'empaqueten en vesícules i es transporten a l'axó per a la seva inserció en la membrana. Només quan els axons són massa llargs aquests processos de síntesi es traslladen majoritàriament a la localització axonal on són necessaris. De fet, s'ha observat que en els axons de cèl·lules de mamífers s'hi localitzen ribosomes i RNAs missatgers (mRNA), suggerint la possibilitat de que també existeix síntesi de proteïnes en els mateixos axons (Steward and Schuman, 2003). Un exemple és el del mRNA de la β -actina, el qual es troba enriquit en neurites i cons de creixement, llocs on el citoesquelet d'actina és molt dinàmic (Bassell et al.).

La zona més distal de l'axó, i per tant l'encarregada de l'elongació, és el con de creixement. El con de creixement és responsable de la generació de tensions que forcin el creixement axonal. Els cons de creixement neuronals com hem comentat anteriorment, presenten dos tipus de filaments, un domini central compost per microtúbuls que s'estén al llarg de l'axó que el precedeix, i un domini perifèric enriquit amb filaments d'actina (Lowery and Vactor, 2009). El punt d'unió entre el domini central i el domini perifèric està ocupat per les miosines, les quals eviten la invasió dels microtúbuls en el con de creixement (Medeiros et al., 2006; Myers et al., 2006). El balanç entre la polimerització anterògrada i la retracció retrògrada determina l'avanç de les estructures d'actina en el domini perifèric.

Els senyals que regulen la polimerització de les fibres d'actina i per tant la reorganització del citoesquelet del con de creixement es troben en la matriu extracel·lular. Quan el con de creixement interacciona amb un substrat o una molècula d'adhesió cel·lular es genera una forta connexió entre els receptors de membrana i el citoesquelet d'actina (Suter et al., 1998). Aquesta unió provoca que la força creada pels motors de miosina associats al citoesquelet disminueixi i el flux de creixement anterògrad sigui superior al retrògrad (Lin and Forscher, 1995). És llavors quan els microtúbuls no troben cap impediment físic i envaeixen el domini perifèric del con de creixement provocant l'elongació de l'axó.

La senyalització implicada en aquest procés és molt diversa i comença en els receptors de membrana que s'associen al citoesquelet d'actina. Just per sota dels receptors hi trobem la família de les RhoGTPases, encarregades de la regulació de la motilitat de l'actina i crítiques per al procés d'elongació. Per sota de les RhoGTPases hi trobem les quinases efectores i les proteïnes d'unió a actina que modulen les senyals extracel·lulars. Un exemple és el de la profilina, la qual potencia la polimerització de l'actina i es troba localitzada en el llindar dels cons de creixement a través de la família de proteïnes *Enabled* i la tirosina quinasa Abl (Wills et al., 1999). Per últim, les proteïnes motores presents en els microtúbuls, com la dineïna, participen activament del procés de creixement axonal gràcies al seu paper en el transport de microtúbuls al llarg de l'axó (Ahmad et al., 1998). Aquestes proteïnes motores també són les encarregades d'envair els cons de creixement durant el procés d'elongació.

Els senyals extracel·lulars més potents en l'inducció del creixement axonal són els factors tròfics peptídics, entre els quals trobem les neurotrofines NGF, BDNF, neurotrofina-3 i neurotrofina-4 (Atwal et al., 2000; Goldberg et al., 2002). Per altra banda, les molècules de la matriu extracel·lular com la laminina i els heparan sulfats, o les molècules d'adhesió cel·lular com les NCAM i la N-Cadherina ajuden durant el procés d'elongació axonal (Riehl et al., 1996; Bard et al.; Li et al.). Tot i això, la funció d'aquestes molècules d'adhesió és de substrat ja que no són suficients per promoure el creixement axonal en absència de factors tròfics (Goldberg et al., 2002). Per últim, les proteïnes encarregades del procés de guia axonal també contribueixen a la senyalització durant l'elongació com és el cas de la netrina-1 (Hengst et al., 2009).

1.2 Vies de senyalització per al creixement i guia axonal: receptors

Netrines

Les netrines són una família de proteïnes que direccionen la migració cel·lular i axonal durant el desenvolupament. En mamífers existeixen tres netrines secretades (netrina-1, -3 i -4), i dues formes anclades a la membrana cel·lular a través d'un glucofosfatidilinositol (netrina-G1 i -G2) (Yurchenco and Wadsworth, 2004). Existeixen dos tipus de receptors per a les netrines, els receptors DCC els quals regulen la quimioatracció (Moore et al.), i els receptors homòlegs d'UNC5 que regulen la repulsió (Hong et al., 1999).

L'estructura de les netrines es caracteritza per la presència de dos dominis N-terminals anomenats V i VI, els quals són homòlegs dels dominis V i VI dels dominis N-terminals de les laminines (Cirulli and Yebra, 2007). Per altra banda, el domini extracel·lular del receptor DCC està compost de sis repeticions del tipus 3 de fibronectina (FN3) i quatre repeticions d'immunoglobulina. Els dominis FN3 del receptor DCC són els encarregats d'interaccionar amb la netrina-1. El domini intracel·lular de DCC no té activitat catalítica, tot i que diversos llocs d'unió a proteïnes i de fosforilació (Geisbrecht et al., 2003).

La senyalització netrines-DCC es produeix en el moment en què ambdues proteïnes interaccionen. Aquest esdeveniment indueix la multimerització dels receptors DCC, situació que permet la unió de la proteïna adaptadora Nck1, les tirosina-quinases Fak i Fyn, la serina/treonina-quinasa Pak i la proteïna d'unió a actina N-WASP (Li, 2002; Shekarabi et al.). Així doncs, l'activació d'aquesta via de senyalització provoca l'activació de les RhoGTPases Rac1 i Cdc42, i l'augment dels nivells de Ca^{2+} intracel·lular, i per tant l'extensió del con de creixement i conseqüentment l'axó (Hong et al., 1999). Aquesta senyalització és finalitzada a través de la proteòlisi del domini extracel·lular del receptor DCC a través de metal·loproteases (Galko, 2000).

Els receptors homòlegs d'UNC5 es componen de dos dominis extracel·lulars d'immunoglobulina, els quals són els llocs d'unió a les netrines. El domini intracel·lular conté un domini ZU5, un *death domain* i un domini d'unió a DCC. Per al procés de repulsió mediat a través de UNC5 no és necessària la unió al receptor DCC excepte en les situacions de més llarg abast, en les quals la unió a DCC proporciona una sensibilitat major a menors concentracions de netrina secretada (Geisbrecht et al., 2003). Un cop es produeix la unió de les netrines a UNC5, aquest es fosforila en les tirosines del seu domini intracel·lular, i indueix la senyalització repulsiva a través de la quinasa Src1 i la fosfatasa Shp2 (Tong et al., 2001).

Semaforines

Les semaforines són una família de proteïnes que poden ser tan solubles (classe II i III), transmembrana (classe I, IV, V i VI) o unides a membrana a través d'un glucofosfatidilinositol (classe VII). El domini més conservat és l'anomenat domini semaforina, el qual està present en el domini N-terminal de la proteïna i permet la interacció amb els receptors corresponents (Koppel et al., 1997). Per contra, el domini C-terminal és diferent segons la classe de semaforina, podent contenir dominis d'immunoglobulina en les classes II-V i VII, o diverses repeticions de trombospondina en el cas de la classe V. Cada classe indueix una resposta diferent per a repulsió o atracció durant el creixement axonal.

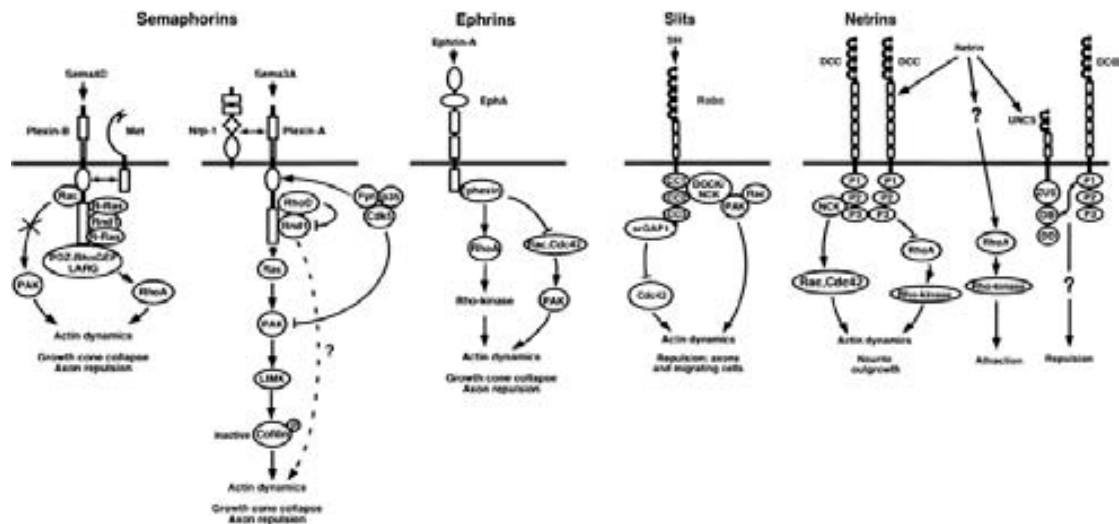


Figura I4 - Principals receptors i lligands per creixement i guia axonal. Semaforines, efrines, slit-robo, i netrines-DCC/UNC.

Les neuropilines són els receptors per a les semaforines secretades i estan compostos d'un domini extracel·lular molt extens, un únic domini transmembrana i una cua citoplasmàtica de només 39 aminoàcids. Existeixen dos classes de receptor amb dominis molt conservats, la neuropilina-1 i la neuropilina-2 (Chen et al., 1997; Kolodkin et al., 1997). El domini extracel·lular conté un domini CUB, el qual és el lloc d'unió a les semaforines. La part intracel·lular està composta per un domini d'unió a motius PDZ el qual permet la homo- o heterodimerització dels receptors per tal de permetre la senyalització a través de semaforines. Per altra banda, els receptors per a les semaforines transmembrana pertanyen a la família de les plexines. Les plexines són proteïnes amb un sol domini transmembrana que contenen un domini N-terminal d'unió a semaforines anomenat *sema*. Les plexines també requereixen la seva dimerització per a la transducció de senyal induïda per semaforines (Kruger et al., 2005). La unió de semaforines als seus receptors indueix la formació de complexos de receptors els quals acaben per activar diverses vies de senyalització que finalitzen en la reorganització del citoesquelet tan d'actina com dels microtúbuls. Entre les diverses vies implicades s'inclouen la de les RhoGTPases amb RhoA i Rac1, la via de les quinases a través de PI3K/Akt, Fyn i GSK-3β; i la via de les MAP quinases amb Erk1/2 (Liu and Strittmatter, 2001; Fujioka et al., 2003; Jin and Strittmatter) (Atwal et al.).

Slit

Les slit són glicoproteïnes de matriu extracel·lular l'estructura de les quals es compon de quatre repeticions rics en leucines, de set a nou repeticions EGF, un domini ALPS, un motiu *laminin G-like* i un domini de cisteïnes. En mamífers existeixen tres isoformes diferents, slit1-slit3. Els receptors per a les proteïnes slit s'anomenen Robo, i pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines. La seva estructura està formada per cinc dominis d'immunoglobulina,

tres repeticions FNIII, un domini transmembrana i una cua citosòlica que conté quatre dominis conservats CCO-CC3 sense activitat catalítica (Dickson and Gilestro, 2006).

La senyalització a través del receptor Robo és produïda gràcies a la interacció de diverses proteïnes després de la fosforilació de la cua citosòlica, induïda per la unió de slit al receptor. Quan Robo s'activa, recluta la tirosina quinasa Abl en els seu domini citosòlic CC2, la qual interacciona amb les proteïnes associades a adenil ciclasa (CAP), regulant així la polimerització de l'actina i potenciant l'efecte repulsiu de la senyalització per slit (Bashaw et al., 2000; Hsouna et al., 2003). Per altra banda, les RhoGTPases també tenen un paper rellevant en la senyalització mediada per Robo, ja que l'activació del receptor per slit permet l'associació amb la proteïna Dock. Dock és una proteïna adaptadora que s'uneix a Robo en els dominis CC2 i CC3 a través d'un domini SH3. Aquesta associació permet a Dock la interacció amb Rac i l'activació de Pak, el seu efector (Fan et al., 2003).

1.3 Les RhoGTPases en el creixement axonal

Les RhoGTPases són una de les famílies més rellevants en la regulació de la organització de les estructures d'actina, i tenen un paper central en la regulació de la dinàmica del con de creixement durant l'elongació axonal. Les RhoGTPases són proteïnes de baix pes molecular que s'uneixen a nucleòtids de guanina. El seu funcionament és d'interruptor molecular a través de la seva capacitat de ciclar entre un estat actiu, en el qual s'uneixen a GTP, i un estat inactiu quan s'uneixen a GDP. Les més conegudes són RhoA, Rac1 i Cdc42 (Heasman and Ridley, 2008). La seva activitat està determinada tan per la ratio de GTP i GDP en la cèl·lula, com per diferents proteïnes reguladores. Els factors d'intercanvi de nucleòtids de guanina (GEFs) activen les GTPases gràcies a la seva capacitat d'intercanviar la GDP unida per GTP. Per contra, les proteïnes d'activació de GTPasa (GAPs) regulen negativament l'activitat de les GTPases degut a la potenciació de la hidròlisi del GTP unit a les GTPases (Schmidt and Hall, 2002).

La senyalització a través de les RhoGTPases està mediada per diversos efectors. En el cas de Rac i Cdc42 l'efector més conegut és la serina/treonina quinasa activada per p21 (PAK)(Bokoch, 2003). Quan PAK, que en estat inactiu es troba autoinhibida, s'uneix a Rac-GTP o Cdc42-GTP, s'activa i s'autofosforila (Buchwald et al., 2001). Entre els mecanismes que regulen el citoesquelet d'actina a través de PAK trobem la fosforilació i activació de Lin-11 i les LIM quinases, que un cop actives són capaces de fosforilar i inhibir la cofilina, un factor despolimeritzador dels filaments d'actina (Dan et al., 2001). La conseqüència de la inhibició de cofilina és l'estabilització i la inducció de la polimerització de l'actina. Per altra banda, PAK també té la capacitat de fosforilar i per tant inhibir la quinasa de la cadena lleugera de la miosina (MLCK), el qual indueix al desacoblament de les fibres d'estrès responsables de la contractibilitat del citoesquelet (Sanders, 1999). Un altre efector molt estudiat és WASP i concretament la seva forma neuronal N-WASP, els quals són efectors de Cdc42. La família de proteïnes WASP s'uneix al citoesquelet d'actina a través de la seva

interacció amb el complex Arp2/3, el qual permet la nucleació per a la formació de nous filaments d'actina (Ho et al., 2004).

Per a RhoA, l'efector principal és la Rho-quinasa (ROCK), la qual controla l'agrupament dels filaments d'actina per fosforilació directa i activació de la cadena lleugera de la miosina (MLC), o indirectament per fosforilació i inactivació de la fosfatasa de MLC (Maekawa, 1999; Kaneko-Kawano et al., 2012) (Riento and Ridley, 2003). A més, ROCK també indueix l'acumulació de F-actina a través de la fosforilació i activació de LIMK, la qual a la vegada fosforila i inactiva la cofilina, un factor de despolimerització d'actina.

Senyalització per RhoGTPases en l'axó

Degut a la influència sobre la regulació del citoesquelet d'actina, la família de les RhoGTPases està implicada durant tots els processos necessaris per al desenvolupament de l'axó. Durant el procés de polarització axonal s'indueix la producció del lípid PIP₃ a través de la PI3 quinasa en la neurita que ha d'esdevenir axó (Oinuma et al.). L'augment de PIP₃ provoca l'activació de la quinasa Akt, la qual a la vegada inactiva GSK-3, un requeriment per a la polimerització dels microtúbuls (Kim et al., 2006). Per altra banda, l'activació de la PI3 quinasa indueix l'activació de Rap1B, la qual a la vegada és capaç d'activar Cdc42 (Schwamborn and Püschel, 2004). Els efectors de Cdc42, Par6/aPKC, regulen l'estabilització dels microtúbuls en l'extrem de l'axó en desenvolupament.

Cdc42 també té la capacitat d'activar Rac, essencial també durant el procés de polarització. L'activació de Rac genera un reforç positiu sobre la via de PI3 quinasa la qual reforça a la vegada la funció de Cdc42 (Nishimura et al., 2005). Simultàniament, Rac també permet el creixement del citoesquelet de microtúbuls a través de la senyalització induïda per la laminina (Watabe-Uchida et al., 2006). Per contra, Rho actua de forma contrària a Cdc42 i Rac durant la polarització neuronal ja que ROCK regula negativament l'extensió de neurites induint l'estabilització de la F-actina (Da Silva et al., 2003).

El paper de les RhoGTPases durant el procés d'elongació axonal s'ha estudiat en diversos sistemes obtenint resultats heterogenis. En *Drosophila* s'ha observat que la inactivació de Rac induïx a dèficits en el creixement axonal suggerint que Rac potencia el creixement axonal (Ng et al., 2002). En neurones corticals de rata en cultiu, la inactivació de Rac produeix la disminució del creixement axonal (Threadgill et al., 1997). Per contra, en cèl·lules de Purkinje de ratolins, l'ús de mutants constitutivament actius de Rac1 també s'ha observat que induïx la reducció del nombre d'axons (Luo et al., 1996). De manera similar, la inactivació de Cdc42 en neurones corticals de ratolí també ha demostrat una reducció del creixement axonal (Threadgill et al., 1997).

Per altra banda, l'activació de Rho s'ha implicat tant en la retracció com l'extensió axonal. La proteïna p190 RhoGAP regula positivament el creixement axonal i l'estabilitat de l'axó a través de la regulació negativa de RhoA (Brouns et al., 2001) (Jeon et al., 2010). S'ha

demostrat que p190 RhoGAP regula l'elongació axonal a través de la inactivació de la via de senyalització RhoA/ROCK, fet que a la vegada significa que la via RhoA/ROCK és necessària per als processos de retracció axonal (Billuart et al., 2001).

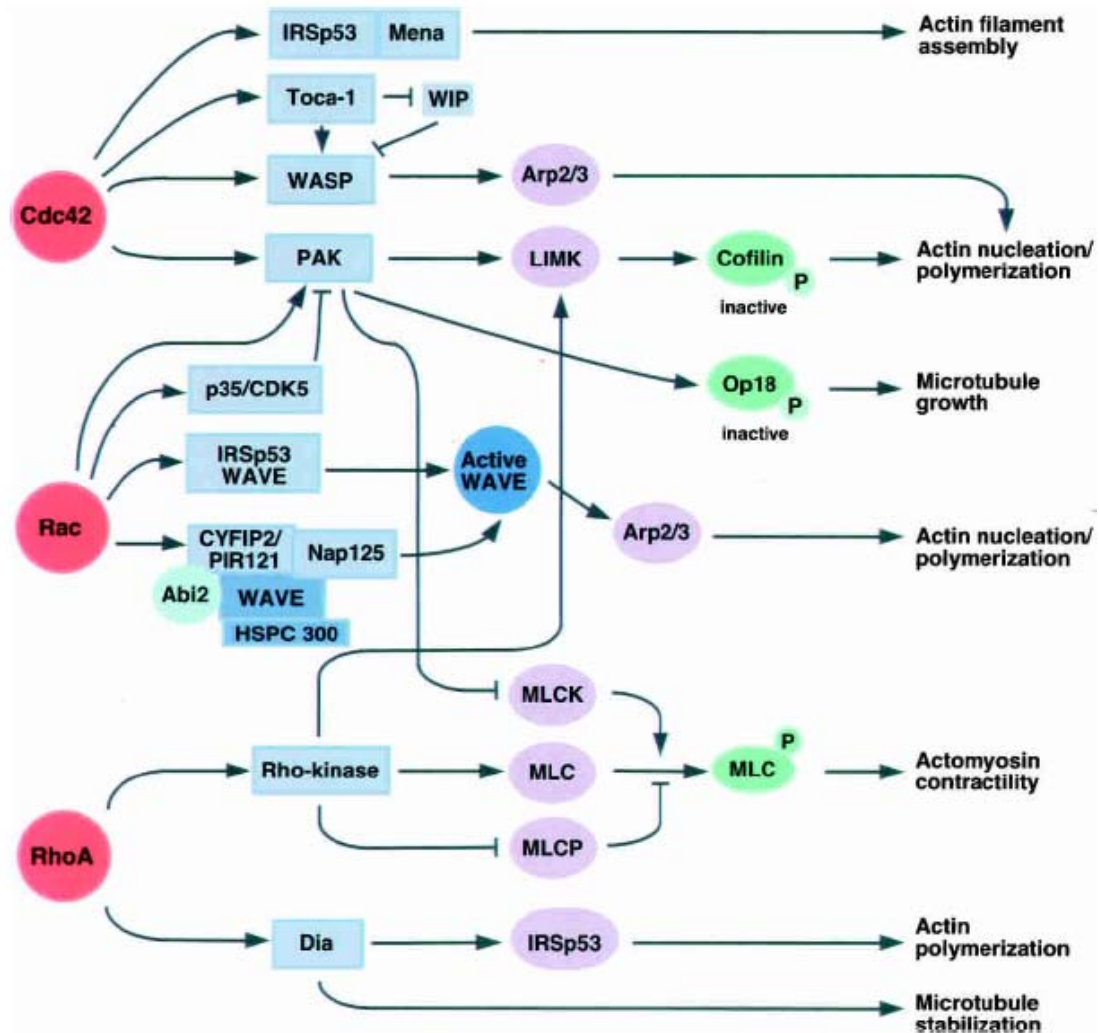


Figura 15 - Vies de senyalització regulades per les Rho GTPases durant l'especificació i el creixement axonal

2. ELS RECEPTORS D'EFRINES EPH

2.1 La família Eph-ephrin

La família de receptors tirosina quinasa Eph està composta per 13 membres diferents. Els seus lligands, les efrines, estan dividides en dues subclasses, les tipus A (ephrinA1-ephrinA5), les quals estan unides a la membrana a través d'un ancoratge per glucosilfosfatidilinositol; i les de tipus B (ephrinB1-ephrinB3), les quals contenen un domini transmembrana i una cua citosòlica (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998).

El conjunt de receptors i lligands EphA/ephrinA i EphB/ephrinB es troben expressats en la majoria de teixits en els embrions de vertebrats. Individualment, els membres de cada classe de receptors Eph o lligands ephrin poden presentar diversos llocs d'expressió que en molts casos es solapen. Més concretament, en el cervell en desenvolupament s'ha observat una expressió molt significativa a nivell de mRNA i proteïna dels receptors EphA3, -A4, -A5, -A6 i -A7, sobretot en les regions medial i lateral de l'hipocamp, i en la zona intermèdia cortical (Yue et al., 2002; Otal et al., 2006; North et al., 2009). Per tant, l'activació dels diferents membres d'aquesta família de proteïnes pot conduir a respostes cel·lulars similars i per tan compartir funcions fisiològiques. Els diferents graus d'afinitat entre els diversos receptors i lligands és el que permetrà diferenciar els nivells de resposta a un mateix estímul (Pasquale, 2005).

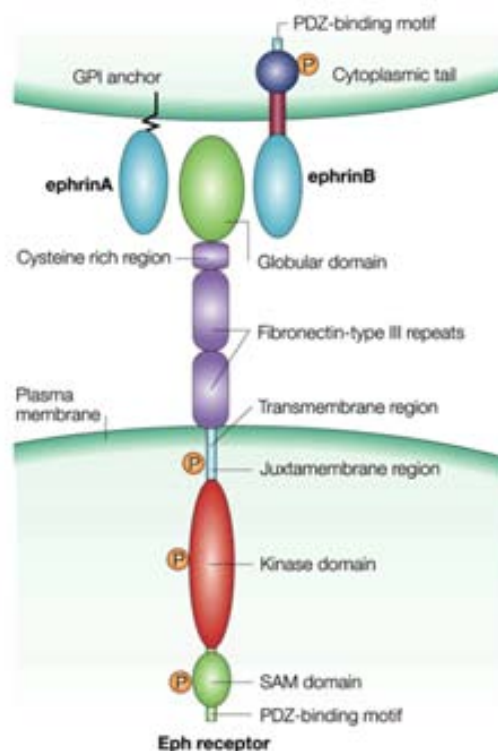


Figura I6 - Estructura i dominis dels receptors i lligands Eph

Els receptors Eph són proteïnes transmembrana de tipus I que estan classificats en base a la similitud de seqüència i la seva afinitat pels lligands, en els receptors de tipus A (EphA1-EphA8), i els de tipus B (EphB1-EphB4 i EphB6). Els receptors EphA s'uneixen als lligands de tipus A, mentre que els receptors EphB s'uneixen als lligands de tipus B, excepte en el cas del receptor EphA4 i el receptor EphB2 que són capaços d'unir-se a lligands tipus A i tipus B (Pasquale, 2004). L'estructura extracel·lular dels receptors Eph està composta d'un domini globular d'unió a lligand, una regió rica en cisteïnes i dos repeticions tipus II de fibronectina (FNIII). Per altra banda, la regió citoplasmàtica dels receptors està composta per un domini juxtamembrana que conté dos residus de tirosina necessaris per a l'activació del receptor. També conté un domini tirosina quinasa, un motiu estèril alfa (SAM) que permet la oligomerització, i un motiu d'unió a dominis PDZ (Huot, 2004).

2.2 Senyalització anterògrada i retrògrada dels complexos Eph-ephrin

Senyalització anterògrada

La formació de clústers de receptors, i la posterior unió de lligands en la senyalització Eph-ephrin, ambdós units a la membrana, indica que el contacte entre cèl·lules és necessari per a l'activació de les vies de senyalització (Wimmer-Kleikamp, 2004). Així, s'anomena senyalització anterògrada a aquella que es desenvolupa en la cèl·lula que expressa el receptor.

El primer pas en la formació de clústers de senyalització Eph-ephrin és la interacció estequiomètrica 1:1 entre el receptor i el lligand en superfícies cel·lulars confrontades (Himanen et al., 2010). El domini d'unió a lligand dels receptors Eph té una cavitat que permet acomodar la regió amb un *loop* hidrofòbic dels lligands ephrin {'Himanen'}. Els complexos Eph-ephrin poden agregar progressivament en grans clústers a partir d'interaccions febles ephrin-ephrin i Eph-Eph. Un cop es generen aquests complexos, la correcta orientació dels dominis tirosina quinasa dels receptors afavoreix la transfosforilació dels dominis citoplasmàtics en els oligòmers. La fosforilació a través de quinases de la família Src, les quals acostumen a estar unides als receptors Eph, també participen d'aquest procés d'activació. El resultat de les fosforilacions en les tirosines citoplasmàtiques, i en especial les presents en la regió juxtamembrana, permeten generar canvis suficients com per interrompre la inhibició conformacional que existeix en els dominis quinasa (Zisch et al., 2000; Wybenga-Groot et al., 2001). La disponibilitat del domini tirosina quinasa dels receptors permet la unió de diverses proteïnes adaptadores que iniciaran les cascades de senyalització per sota del receptor (Davis et al., 2008).

Les diverses proteïnes adaptadores que s'uneixen al receptor a través dels dominis SH2 i SH3 per crear complexos proteics de senyalització desenvolupen diferents funcions, entre les quals destaca la regulació del creixement axonal, la seva guia durant el desenvolupament i

l'establiment de sinapsis (Introducció - Apartat 2.3 i Apartat 2.4). Tot i així, la família Eph-ephrin també té altres funcions fisiològiques com la regulació del citoesquelet, de la mitogènesi o de les interaccions amb la matriu extracel·lular.

Mitogènesi

Els receptors Eph són reguladors negatius de la senyalització induïda extracel·lularment de la via de les ERK/MAPK quinases. Alguns estudis demostren com l'estímul a través del lligand ephrinA1 suprimeix l'activitat ERK/MAPK i coneqüentment disminueix la proliferació de cèl·lules immortalitzades de l'epiteli prostàtic i de cèl·lules primàries de càncer de pròstata (Miao et al., 2001).

Adhesió cel·lular

La unió de les cèl·lules neuronals a la fibronectina, present en la matriu extracel·lular, activa la via ERK/MAPK a través de la senyalització per integrines. En aquestes condicions, s'ha observat que l'activació dels receptors EphB2 redueix l'activació d'ERK/MAPK. Quan EphB2 s'activa, s'indueix la fosforilació de R-Ras i per tant disminuint la capacitat de R-Ras per intervenir en la senyalització a través de les integrines (Zou et al., 1999; Zisch et al., 2000; Wybenga-Groot et al., 2001; Goldberg et al., 2002). En el sentit contrari, també s'ha observat que el receptor EphB1, a través del seu efector Nck, és capaç de potenciar la senyalització durant el procés d'adhesió induïda per d'integrines (Huyhn-Do et al., 1999; Davis et al., 2008; Hengst et al., 2009).

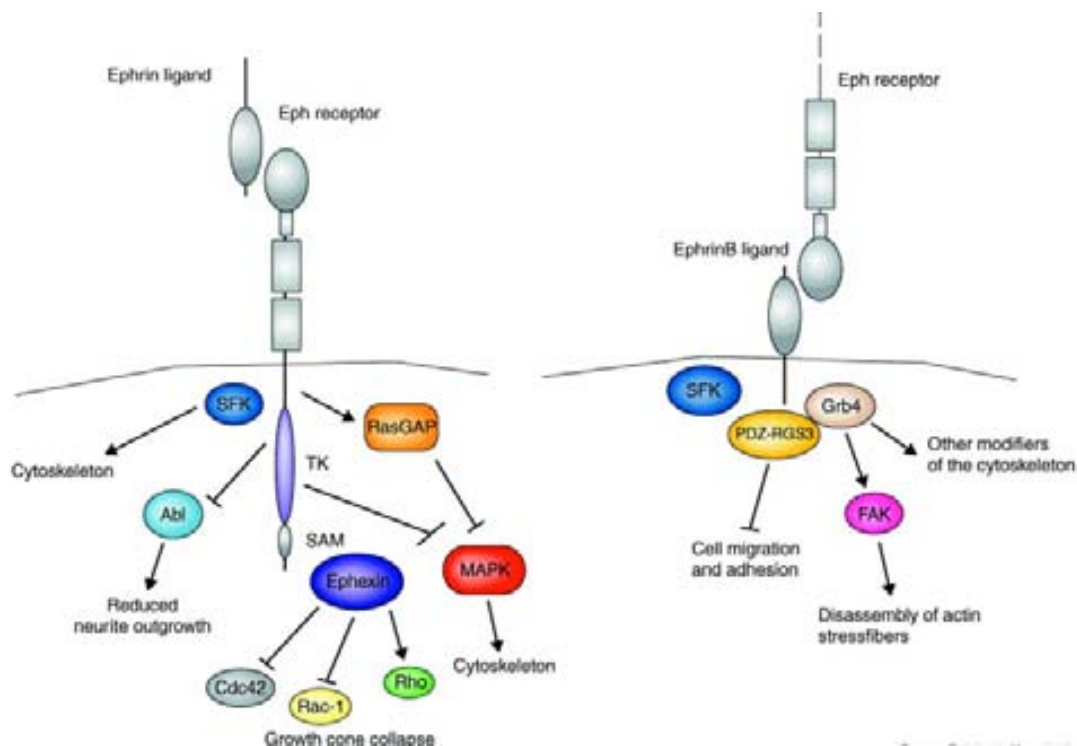


Figura I7 - Senyalització bidireccional a través dels receptors i lligands d'efrina

Senyalització retrògrada

El fet que els lligands ephrin de tipus A i B estiguin units a la membrana cel·lular ja sigui a través d'ancoratges GPI com a través de dominis transmembrana, confereix una propietat rellevant als lligands consistent en la capacitat de senyalització en la cèl·lula que els expressa.

Els lligands de tipus A localitzen en *lipid rafts* degut al seu domini de membrana GPI (Miao et al., 2001; Gauthier and Robbins, 2003; Yurchenco and Wadsworth, 2004). Les proteïnes que s'associen en aquest mateix espai permeten que es produeixi una transducció de senyal cap a l'interior de la cèl·lula anomenada *cis*. Entre les molècules identificades per aquest tipus de senyalització hi ha les integrines, que permeten, juntament amb els lligands ephrinA, la regulació de l'adhesió cel·lular mediada per molècules de la matriu extracel·lular (Zou et al., 1999; Davy and Robbins, 2000; Moore et al.). L'adhesió cel·lular forma part del primer pas per poder iniciar una resposta retrògrada de repulsió. Per als lligands ephrinB s'ha demostrat que la unió de receptors EphB indueix un efecte repulsiu en l'axó de la cèl·lula que conté el lligand. Els lligands ephrinB contenen en la seva cua citosòlica dos dominis diferenciats, un d'unió SH2 i un altre d'unió PDZ. Els dominis SH2 quan són activats es fosforilen en els residus de tirosina per quinases de la família Src (Lu et al., 2001) (Xu and Henkemeyer, 2009).

Finalització de senyal

Un cop formats els complexos de senyalització Eph-ephrin cal finalitzar la senyalització per poder generar l'efecte de repulsió cel·lular. Perquè això es produeixi cal trencar la interacció d'alta afinitat que es genera un cop units receptor i lligand. Els dos mecanismes que permeten aconseguir aquest efecte són els de la escissió i la endocitosi. Les proteases de tipus desintegrina i metal·loproteasa (ADAMs) són capaces de proteolitzar els lligands ephrinA i ephrinB de forma *cis* en la mateixa cèl·lula o en *trans* quan són a la cèl·lula oposada (Janes et al., 2005) (Hong et al., 1999; Huynh-Do et al., 1999; Georgakopoulos et al., 2006). Un exemple és l'associació d'ADAM10 a EphA3 a través del domini d'unió a lligand del receptor. La unió entre el lligand ephrinA5 i el receptor EphA3 en la cèl·lula oposada, indueix l'escissió del domini extracel·lular d'ephrinA5 a través d'ADAM10, permetent així la separació entre les cèl·lules en contacte (Gauthier and Robbins, 2003; Janes et al., 2005; Cirulli and Yebra, 2007).

Per altra banda l'endocitosi permet eliminar per complet els complexos Eph-ephrin de la membrana, el qual permet la separació entre les membranes de cèl·lules oposades (Davy and Robbins, 2000; Geisbrecht et al., 2003; Zimmer et al., 2003). De fet, és molt possible que el procés de proteòlisi del lligand sigui un pas posterior a la internalització dels complexos formats per receptors i lligands. Alguns treballs mostren com pel receptor EphB2, un cop s'uneix al lligand ephrinB2, s'estimula la internalització en endosomes on poden trobar-se

intactes els clústers formats. Per a que aquest procés es dugui a terme cal que prèviament el receptor o el lligand siguin processats en la cèl·lula oposada (Lu et al., 2001; Litterst et al., 2007). D'aquesta manera, no només per als lligands ephrin sinó també en el cas dels receptors EphB2 i EphA4 (Inoue et al., 2009; Xu and Henkemeyer, 2009), s'ha observat el processament per metalloproteases i posteriorment per γ -secretasa. Molt probablement els endosomes on s'internalitzen inicialment són el lloc on es produeixi el processament del receptor pel complex γ -secretasa, dirigint els fragments a la degradació per la via proteosomal i lisosomal.

Per últim, també s'ha descrit una forma d'atenuació de la senyalització en la via Eph-ephrin consistent en la interacció en *cis* de lligands i receptors en una mateixa cèl·lula, un tipus de reducció de senyal molt més suau que l'endocitosi o el processament (Carvalho et al., 2006). Aquest tipus de silenciament de senyal s'ha observat durant el desenvolupament dels axons retinals. Així doncs, els nivells d'expressió de lligands ephrin serien responsables del grau d'activitat dels receptors Eph dins d'una mateixa cèl·lula, modulant així la senyal repulsiva dependent d'aquesta via.

2.3 Senyalització Eph-ephrin durant l'elongació i guia axonal

El principal paper de la via Eph-ephrin durant el desenvolupament del sistema nerviós central (CNS) es produeix durant el procés d'elongació axonal, induint majoritàriament la retracció i repulsió dels axons. La senyalització anterògrada, com s'ha comentat anteriorment, està implicada en els processos d'elongació axonal i també de migració cel·lular. Aquesta via de senyalització regula la dinàmica del citoesquelet d'actina a través de la família de les RhoGTPases. Una de les primeres observacions d'aquesta implicació va ser a partir d'axons retinoganglionars en els que la estimulació per ephrinA5 induïa l'activació de RhoA i el seu efector ROCK, a la vegada que causava la inactivació de Rac1 (Wahl et al., 2000).

En el cas dels receptors EphA4, es va identificar l'efector que permetia la unió entre el receptor i les RhoGTPases. Ephexin és una RhoGEF que es troba unida als receptors EphA4 de forma constitutiva en el CNS i que té afinitat per RhoA, Rac1 i Cdc42 (Shamah et al., 2001). En el moment que es produeix l'activació d'EphA4 a través del lligand ephrinA1, l'activitat GEF d'ephexin induïx l'activació de RhoA. De manera simultània induïx la inactivació de Rac1 i Cdc42, i per tant la cascada de senyalització a través de PAK. En conjunt, tots aquests esdeveniments produeixen la contracció del citoesquelet a través de la formació de fibres de estrès i per tant, l'efecte repulsiu en l'axó en desenvolupament (Janes et al., 2005; Sahin et al., 2005). De forma similar, la interacció entre EphA4 i l'inactivador RacGAP α -chimerina és necessària per la repulsió axonal en els circuits espinals que controlen els processos locomotors (Wegmeyer et al., 2007). En aquesta mateixa via estan implicades les proteïnes adaptadores Nck1 i Nck2/Grb4.

El receptor EphB2 també és capaç de regular el citoesquelet d'actina. Quan EphB2 es actiu s'indueix la inhibició de la GTPasa Ras (Miao et al., 2001), la qual està involucrada en la regulació de l'elongació de neurites a través de molècules de matriu extracel·lular per la via ERK/MAPK. L'efecte de la inhibició sobre Ras acaba per induir la retracció neurítica. També és conegut que el receptor EphB2 i el receptor EphA4 interaccionen amb la família Vav de proteïnes activadores de RhoGTPases. Aquesta interacció potencia la endocitosi dels receptors Eph que té com a conseqüència el col·lapse del con de creixement i defectes en la guia axonal (Cowan et al., 2005).

Els efectes sobre el creixement axonal també poden ser descrits des de la perspectiva de la senyalització reversa. S'ha observat en els axons de neurones retinoganglionars una interacció *cis* entre els receptors TrkB i les ephrinA recluta sobre aquestes últimes la tirosina quinasa Fyn (Lim et al., 2008). L'activació de Fyn permet la inducció de la ramificació axonal com a resposta a BDNF. En els axons motors, la interacció entre els lligands ephrinA i els receptors tirosina quinasa Ret indueix l'atracció axonal (Hong et al., 1999; Georgakopoulos et al., 2006; Kramer et al., 2006). En canvi, en les neurones retinoganglionars, la interacció d'ephrinA al receptor p75NTR i la formació d'un complex amb el receptor EphA7 indueix la repulsió axonal (Galko, 2000; Janes et al., 2005; Lim et al., 2008).

En el cas dels lligands de tipus B, s'ha descrit que l'activació de la senyalització reversa en neurones indueix la fosforilació de Dab1, un dels efectors més importants en la via de senyalització de la reelina, una glicoproteïna de matriu extracel·lular implicada en processos de migració neuronal (Sentürk et al., 2011). La senyalització reversa a través dels lligands ephrinB en els cons de creixement es veu iniciada a través de la fosforilació dels residus de tirosina del domini citosòlic. Aquesta fosforilació permet reclutar les proteïnes adaptadores SH2/SH3 GRB4/Nck β /Nck2 per tal de regular a través de Rac1 i PAK1 senyals de retracció (Xu and Henkemeyer, 2009). La fosforilació del lligand ephrinB3 permet la unió de Nck2/Grb4, PAK1, la RacGEF Dock180 i Rac1 formant un complex que regula la retracció i fins i tot l'eliminació d'axons en etapes més tardanes de la maduració en l'hipocamp. Per altra banda, en el domini PDZ dels lligands ephrinB s'ha trobat la unió de PDZ-RGS3 que regula processos de migració.

2.4 Funció de Eph-ephrin en les sinapsis

Els receptors Eph i els seus lligands estan involucrats en el desenvolupament i maduració de sinapsis. La senyalització d'ambdós és necessària per a la regulació tan de la sinaptogènesi com per a la modulació de la funció sinàptica. L'expressió pre- i postsinàptica dels receptors i els lligands es produeix durant totes les fases del desenvolupament neuronal (McClelland et al., 2010). En les neurones de la regió CA1 de l'hipocamp, els receptors EphB2, EphB3 i EphA7 es troben enriquits en les densitats postsinàptiques de les espines dendrítiques (Grunwald et al., 2004; Carvalho et al., 2006). En el terminal presinàptic s'ha observat també la presència del receptor EphA4 i també EphB2 (Wahl et al., 2000; Bouvier et al., 2008). El

receptor EphB3 es troba enriquit en les cèl·lules piramidals de la capa V del còrtex somatosensorial. Entre els lligands, s'ha observat l'expressió de ephrinB1 i ephrinB3 en els terminals de les *mossy fibers* del gir dentat, mentre que els lligands ephrinB2 i ephrinB3 estan enriquits en les densitats postsinàptiques de les neurones CA1. En les capes II i III del còrtex s'ha observat l'expressió de ephrinB2, mentre que només durant el desenvolupament s'hi ha observat l'expressió de ephrinB3 (Grunwald et al., 2004; Migani et al., 2009; McClelland et al.).

Diferenciació presinàptica

Els receptors EphB són necessaris per a la motilitat dels filopodis dendrítics, la formació de sinapsis i el reclutament i formació de clústers de receptors de glutamat en les sinapsis (Dalva et al., 2000). Els lligands ephrinB1 i ephrinB2 són responsables de la inducció dependent del receptor EphB2 de llocs presinàptics. De fet l'expressió postsinàptica del receptor EphB2 induïx la diferenciació presinàptica a través de la unió amb els lligands ephrinB1 i ephrinB2 (McClelland et al., 2009). Els lligands ephrin contenen dominis d'unió a PDZ els quals els hi proporcionen l'habilitat d'associar-se a proteïnes que contenen dominis PDZ. Quan EphB2 uneix ephrinB1 o ephrinB2 presinàptics, els lligands recluten en el seu domini PDZ la proteïna syntenin-1. La syntenin-1 permet la formació de clústers de vesícules sinàptiques a través de la organització d'un complex multiproteic, que conté les proteïnes vesiculars presinàptiques ERC2/CAST1, RIM i Rab (Grembecka et al., 2006; Ko et al., 2006).

En les sinapsis madures, els lligands ephrinB poden controlar la funció presinàptica. En les *mossy fibers* de les sinapsis CA3 de l'hipocamp, els lligands ephrinB presinàptics poden modular la inducció de la potenciació a llarg termini (LTP) independentment dels receptors NMDA (Armstrong et al., 2006; Dickson and Gilestro, 2006; Lim et al., 2008). L'enriquiment del lligand ephrinB3 en aquests terminals permet el reclutament de més vesícules de neurotransmissors a les zones presinàptiques actives, induïnt d'aquesta manera la LTP (Rodenas-Ruano et al., 2006; Sentürk et al., 2011). Els lligands ephrinA5 presinàptics també potencien la formació de sinapsis induïdes per BDNF. L'expressió d'ephrinA5 permet potenciar la senyalització de TrkB, el qual un cop activat per BDNF, augmenta l'activació de la via de senyalització de PI3 quinasa/AKT. Posteriorment, la unió de receptors EphA postsinàptics amb ephrinA5 trenca l'associació entre el lligand i els receptors TrkB, situació que condueix a la supressió de la sinaptogènesi induïda per BDNF (Marler et al., 2008; Xu and Henkemeyer, 2009).

Diferenciació postsinàptica

Els lligands ephrinB també regulen a nivell postsinàptic la plasticitat, la espinogènesi, el reclutament de receptors de glutamat i la formació de densitats sinàptiques. Respecte l'espinogènesi, els lligands ephrinB permeten la transició dels filopodis a espines a través del reclutament de la proteïna GIT1, la qual permet l'activació de la RhoGTPasa Rac,

encarregada de reorganitzar el citoesquelet d'actina necessari per a la formació de sinapsis (Segura et al., 2007). El lligand ephrinB3, el qual conté *D-domain* d'unió a Erk, s'especialitza en la unió de proteïnes que permeten el control de la densitat sinàptica. La inhibició de l'activitat Erk2 a través d'ephrinB3 permet augmentar la densitat sinàptica en neurones corticals (Fan et al., 2003; McClelland et al., 2010).

Els receptors EphA també són reguladors importants de la morfologia de les espines dendrítiques en l'hipocamp. El lligand ephrinA5 s'ha relacionat amb la regulació de la densitat d'espines i sinapsis en el còrtex i l'hipocamp. De fet els ratolins *knockout* per ephrinA5 presenten un augment en les protrusions basades en filopodis durant el desenvolupament, el que es tradueix en un menor nombre d'espines dendrítiques un cop finalitza l'etapa de la sinaptogènesi (Fan et al., 2003; Heasman and Ridley, 2008; Guellmar et al., 2009; McClelland et al., 2010). En la regulació sinàptica, la relació entre les neurones i la glia també hi té un paper rellevant. En l'hipocamp, l'expressió de lligand ephrinA3 en astròcits regula la morfogènesi de les espines dendrítiques, el transport de glutamat i la LTP en les sinapsis entre CA1 i CA3, a través de la interacció amb el receptor EphA4 present en les dendrites de les neurones piramidals (Schmidt and Hall, 2002; Grunwald et al., 2004; Filosa et al., 2009).

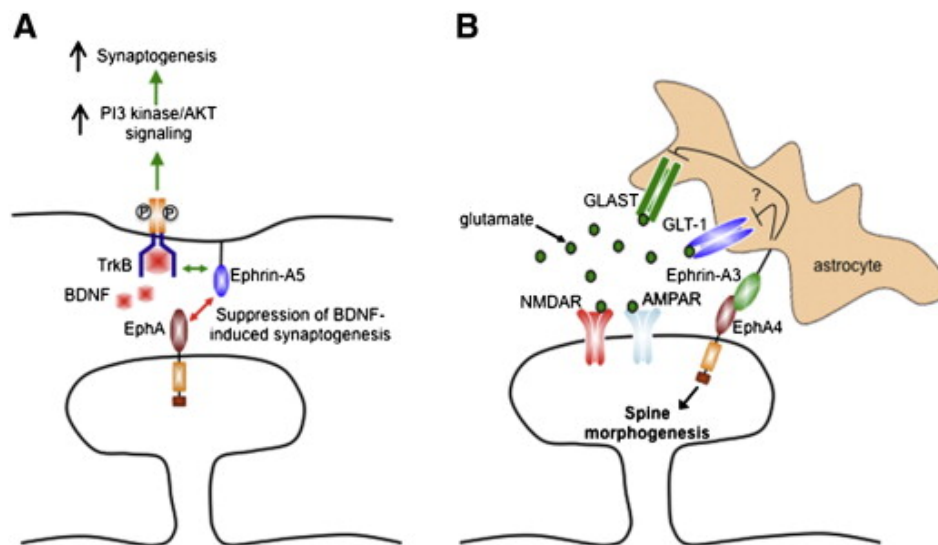


Figura 18 - Vies de regulació de la plasticitat sinàptica a través dels receptors i lligands d'efrina

Modulació de la plasticitat sinàptica

La modulació de la intensitat sinàptica a través de lligands ephrinB depèn de l'estabilització dels receptors AMPA en la membrana sinàptica. Els receptors AMPA s'uneixen al lloc PDZ de ephrinB2 juntament amb la proteïna GRIP1, després de que ephrinB2 sigui fosforilada en

la seva cua citosòlica. Quan es produeix el complex ephrinB2-GRIP1, els receptors AMPA s'uneixen al complex i queden retinguts en la superfície de la sinapsi (Bokoch, 2003; Bouvier et al., 2008; Essmann et al., 2008).

Per altra banda, la regulació de la intensitat sinàptica en les neurones piramidals de CA1 en l'hipocamp es produeix a través de la regulació del lligand ephrinB3 que interacciona en *cis* amb el receptor EphB2, inhibint la seva activitat tirosina quinasa. La inhibició del receptor EphB2 produeix una disminució de les corrents induïdes pels receptors NMDA (Buchwald et al., 2001; Grunwald et al., 2004; Antion et al., 2010).

2.5 Implicació de la senyalització Eph-ephrin en patogènesi

Malaltia d'Alzheimer

El deteriorament i pèrdua de les sinapsis és un fet rellevant en la malaltia d'Alzheimer (AD), situació que es produeix acompanyada pels canvis en la composició i funció de les proteïnes sinàptiques. És molt rellevant l'observació d'una reducció dramàtica dels receptors EphA4 i EphB2 en els teixits hipocampals en pacients en fase II-III de la malaltia (Dan et al., 2001; McClelland et al., 2009; Simón et al., 2009). Degut a la importància durant la generació i el manteniment de les sinapsis de la via de senyalització Eph-ephrin, és molt probable que aquesta tingui alguna implicació en la malaltia.

La generació dels pèptids de beta-amiloide (A β), un dels elements més característics en AD, es produeix a través del complex γ -secretasa. Aquest mateix complex és l'encarregat de processar el receptor EphA4 en els *lipids rafts* sinàptics generant un fragment intracel·lular EphA4 ICD. En els terminals postsinàptics, EphA4-ICD és capaç d'activar Rac1 i així induir la formació d'espines dendrítiques (Sanders, 1999; Inoue et al., 2009; Migani et al., 2009). La desregulació de l'activitat γ -secretasa i per tant la disminució en la generació d'EphA4-ICD podria ser un fet rellevant en el manteniment de les sinapsis en la malaltia d'Alzheimer. De fet, en Alzheimer s'observa una disminució de l'activitat PAK1 i la formació d'agregats patològics de cofilina, ambdues proteïnes regulades per Rac1 (Grunwald et al., 2004; Ho et al., 2004; Zhao et al., 2006; McClelland et al., 2009; Migani et al., 2009). Per altra banda, el processament del receptor EphB2 pel complex γ -secretasa genera un fragment C-terminal, el qual està implicat en el manteniment en la superfície sinàptica de receptors NMDA. De fet, el pèptid A β té una alta afinitat pel domini extracel·lular del receptor EphB2, induint a la degradació mediada per proteosoma del receptor i produint una disminució del nombre d'espines dendrítiques i proteïnes sinàptiques (Dalva et al., 2000; Lacor et al., 2007).

També s'ha observat que els nivells de proteïna de dos transportadors de glutamat en els astròcits que envolten la sinapsi, estan regulats per la senyalització retrògrada de la via Eph-ephrin. La pèrdua de l'expressió del lligand ephrinA3 en glia o del receptor EphA4 en els terminals postsinàptics produeix una disminució de l'expressió de la proteïna GLT1, i produeix una disminució de l'aprenentatge i la memòria en ratolins (Carmona et al., 2009;

McClelland et al., 2009). Un altra observació rellevant és la relació entre els receptors metabotrópics de glutamat i la senyalització Eph. S'ha descrit que els receptors mGluR1 formen complexos funcionals amb el lligand ephrinB2 i els receptors NMDA. Quan els receptors mGluR s'activen, es potencia la excitotoxicitat en les neurones a través dels receptors NMDA, esdeveniment que és potenciat per la presència del lligand ephrinB2 en estat actiu. Aquest tipus d'excitotoxicitat en pacients d'AD està típicament induïda per A β , i per tant l'atenuació de la senyal a través de la via Eph-ephrin podria ser interessant com a tractament (Zhuang et al., 2010b).

En AD també s'ha observat que els pacients presenten, en l'hipocamp o en el sèrum, una disminució de D-serina, un derivat de la L-serina generat per serina racemasa. La unió de D-serina a receptors NMDA potencia les corrents sinàptiques induïdes per aquests, les quals en pacients d'AD es troben disminuïdes (Riento and Ridley, 2003; Ko et al., 2006; Turpin et al., 2011). Alhora, s'ha observat que l'expressió d'ephrinB3 postsinàptica és capaç de potenciar la producció de D-serina a través dels receptors EphB3 i EphA4 expressats en astròcits, però com s'ha comentat anteriorment, l'expressió de receptors Eph en pacients d'Alzheimer es troben disminuïda (Grembecka et al., 2006; Ko et al., 2006; Zhuang et al., 2010b; Oinuma et al.). Així doncs, és probable que existeixi una relació directe en pacients de la malaltia entre la disminució de l'expressió de receptors Eph i la disminució de les corrents sinàptiques induïdes per receptors NMDA.

Càncer

Diversos estudis han correlacionat els nivells d'expressió dels receptors Eph i els lligands ephrin amb la progressió, el procés de metastasi i la supervivència dels pacients durant el càncer. Un exemple és el del receptor EphA2, l'expressió del qual està augmentada en diversos càncers i la seva expressió s'ha lligat a l'increment de la malignitat i una prognosi clínica desfavorable (Wykosky and Debinski, 2008; Zhuang et al., 2010a). El receptor EphB4 també està àmpliament expressat en les cèl·lules cancerígenes i la seva abundància correlaciona amb la progressió del càncer (Watabe-Uchida et al., 2006; Segura et al., 2007; Kumar et al., 2009). A diferència dels anteriors, l'expressió del receptor EphA1 està disminuïda en els càncers de pell i colorectals (Da Silva et al., 2003; Herath et al., 2009; McClelland et al., 2010); en general l'expressió dels receptors Eph de tipus B disminueix en càncer colorectal en estadis avançats, el receptor EphB6 disminueix en els càncers de pulmó i l'expressió del lligand ephrinA5 disminueix en els glioblastomes (Müller-Tidow et al., 2005; Li et al., 2009).

Les mutacions en els receptors Eph també correlacionen amb l'aparició de diversos tipus de càncer. Mutacions en el receptor EphB2 s'han identificat en tumors de pròstata, gàstrics i colorectals, i carcinomes de pell dependents de queratinòcits (Huusko et al., 2004; Davalos et al., 2006; Guo, 2006; Zogopoulos et al., 2008). Algunes d'aquestes mutacions inhibeixen l'activitat quinasa del receptor. També els receptors EphA3 i EphA5 muten freqüentment en

càncer de pulmó, presentant mutacions que afecten les regions extracel·lulars i especialment el domini d'unió a lligand.

3. LES PRESENILINES I EL COMPLEX γ -SECRETASA

3.1 Estructura i localització de les presenilines

La identificació dels gens que codifiquen per les presenilines (PS) es va produir a partir de l'anàlisi de famílies amb formes heretades de la malaltia d'Alzheimer (AD). En aquestes famílies es van trobar mutacions en els gens que codificaven per presenilina-1 (PSEN1) i presenilina-2 (PSEN2) en els cromosomes 14 i 1 respectivament (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995), les quals presentaven una homologia de seqüència d'aproximadament el 65%. Presenilina-2 (PS2) és 4 aminoàcids més curta degut a l'absència dels residus 26-29 en la cua N-terminal.

Les presenilines (PS1 i PS2) són proteïnes integrals de membrana que es caracteritzen per tenir activitat aspartil proteasa. El model més acceptat en quant a l'estructura de les PS s'ha descrit per PS1, d'ambdós gens, el més estudiat. PS1 estaria composta de 9 dominis transmembrana, on la cua N-terminal i el *loop* hidrofílic format pels dominis transmembrana 6 i 7 estarien localitzats en el citosòl, mentre que la cua C-terminal de PS1 estaria orientada cap a l'espai luminal o extracel·lular (Laudon et al., 2005). Tot i això, tan en els models previs que determinen 7 o 8 dominis transmembrana (TMD) per PS1, coincideixen en determinar que els residus Asp257, en el domini hidrofòbic TMD6, i Asp385 en el domini hidrofòbic TMD7 formen el centre catalític de les presenilines (Wolfe et al., 1999; Pasquale, 2005).

PS1 es sintetitza com un polipèptid de 42-43 kDa, tot i que en cèl·lules de mamífers i cervells de rosegadors, primats i humans, s'observa l'acumulació de fragments de PS1 de 27-28 kDa i 16-17 kDa que corresponen als fragments N-terminal (TMD1-6) i C-terminal (TMD7-9) respectivament (Thinakaran et al., 1996; Pasquale, 2004). L'origen d'aquests dos fragments de PS1 és el resultat del processament autoproteolític dut a terme per la pròpia PS1 en el *loop* citoplasmàtic entre les regions TMD6 i TMD7. Un cop es produeix el processament, el fragment N-terminal i C-terminal de PS1 formen complexos heterodimèrics, la formació dels quals es veu limitada per la presència d'altres proteïnes cel·lulars (Wolfe, 2001; Huot, 2004). La presència dels fragments C-terminal i N-terminal reflecteix l'estat actiu de l'activitat enzimàtica de PS1.

PS1 s'ha trobat localitzada en el reticle endoplasmàtic, la xarxa *cis*-Golgi, en vesícules de transport i en la membrana citoplasmàtica (Annaert et al., 1999). També s'ha observat la localització de PS1 en la membrana nuclear, en els centrosomes de cèl·lules en divisió, i en punts de la membrana interna nuclear associada amb els cinetocors de la interfase durant processos d'organització i segregació cromosòmica (Kovacs et al., 1996; Li et al., 1997).

En neurones hipocampals en cultiu s'ha observat que, durant les etapes inicials de la diferenciació neuronal, PS1 està localitzada tan en el soma com en els processos neurífics. Després de la diferenciació, PS1 es concentra en la regió somatodendrítica tot i que pot ser localitzada en menor mesura en els axons. De fet, l'extensa localització de PS1 en les

neurites i també en els cons de creixement suggereix que PS1 estigui relacionada amb processos de diferenciació neuronal (Busciglio et al.). Altres estudis també han demostrat que els fragments N-terminal i C-terminal de PS1 localitzen tan en vesícules sinàptiques com en cons de creixement de cervells de rata (Behr et al., 1999). En concordança amb els anteriors treballs també es va observar que PS1, en cultius de neurones primàries es trobava associat amb el citoesquelet, interaccionant tan amb microtúbuls com amb els filaments d'actina en els cons de creixement a través de proteïnes Tau o filamina respectivament (Pigino et al., 2001). A nivell neuronal, PS2 resulta menys rellevant degut a la seva baixa expressió (Sherrington et al., 1996). De fet, l'activitat γ -secretasa és menor en comparació a PS1, la qual s'ha pogut observar a partir de la delecció de PS1, on l'activitat γ -secretasa resultava més reduïda que quan PS2 era deleccionada (Zhang et al., 2000; Lai et al., 2003).

3.2 Funcions biològiques de les presenilines

3.2.1 El complex γ -secretasa

El complex γ -secretasa pertany a la família de proteases intramembrana I-CLiPs. γ -Secretasa és l'única proteasa tipus I-CLiP que forma un complex, a diferència de la resta que són enzims compostos d'una sola proteïna. γ -Secretasa està composta de 4 proteïnes integrals de membrana: presenilina, nicastrina, Aph-1 i Pen-2, sent la presenilina la subunitat catalítica amb l'activitat aspartil proteasa (de Strooper et al., 1998).

Aph-1 és una proteïna de 7 dominis transmembrana, Pen-2 presenta 2 dominis transmembrana en conformació de forquilla que exposa les dues cues terminals en la regió luminal o extracel·lular, i nicastrina és una glicoproteïna transmembrana de tipus 1 amb un domini luminal/extracel·lular molt extens..

L'ectodomini de nicastrina està implicat en l'assemblatge i maduració del complex, a la vegada que participa durant l'activació del complex γ -secretasa (Shirovani et al., 2003). El procés d'ensamblatge consisteix en diversos passos seqüencials, el qual s'inicia amb la formació d'un subcomplex per nicastrina i Aph-1 (Shirovani et al., 2004). A continuació, presenilina s'uneix al complex nicastrina-Aph1, i finalment Pen-2 s'uneix al complex induint l'activació per endoproteolisi de presenilina. Aquest procés es duu a terme en el reticle endoplasmàtic rugós, tot i així l'activació del complex succeeix posteriorment en vesícules de l'aparell de Golgi (Kim et al., 2007).

La purificació de complexos funcionals ha revelat que aquests components s'associen en proporció 1:1:1:1 (Sato et al., 2007). El fet que existeixin dues isoformes en mamífers per a les presenilines i tres formes per Aph-1 suggereix que puguin formar-se sis complexos γ -secretasa diferents. L'estudi estructural del complex γ -secretasa també ha permès mostrar com aquest adquireix una conformació esfèrica amb dues obertures centrals, una orientada a l'espai extracel·lular i l'altra orientada cap al citosol. Així, en el complex es formaria una gran

cavitat hidrofílica, on es produiria la catàlisi, i les obertures permetrien la sortida dels productes de proteòlisi del complex (Lazarov et al., 2006)

L'especificitat de substrat per l'activitat proteolítica de γ -secretasa és un aspecte àmpliament discutit. El que sembla segur fins a la data és que no existeix cap tipus de seqüència de tall consens entre els substrats coneguts. Tot i això, existeixen diversos requeriments que s'han de complir per a que una proteïna sigui proteolitzada per γ -secretasa: 1) presentar una hèlix tipus 1 transmembrana, 2) un ectodomini curt, el qual acostuma a obtenir-se per un processament previ per metal·loproteases, 3) dominis juxtamembrana i citosòlics permissius per la unió del complex al substrat, i 4) residus que permetin desestabilitzar la configuració d'hèlix en el domini transmembrana (Hemming et al., 2008).

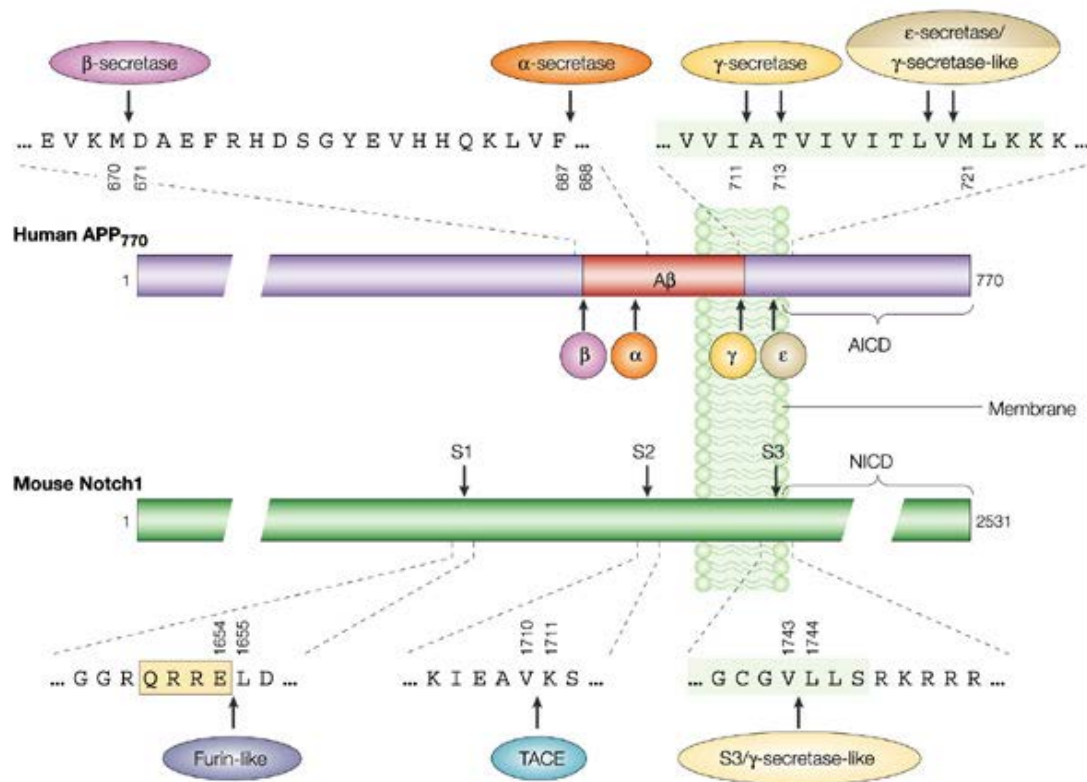


Figura 19 - Processament de substrats per PS/ γ -secretasa: APP i Notch-1

3.2.2 Mecanisme de proteòlisi per PS/ γ -secretasa

Generalment, la família de metal·loproteases ADAM són les responsables de l'escissió de l'ectodomini dels substrats de PS/ γ -secretasa en la superfície cel·lular. Els fragments C-terminals (CTFs) resultants són processats per PS/ γ -secretasa en la membrana cel·lular o

durant processos d'endocitosi (Urra et al., 2007). L'expressió de substrats en superfície disminueix després del processament dels ectodominis i els seus CTFs es troben en compartiments intracel·lulars, com és el cas de Notch, el qual requereix una ubiquitinització i l'endocitosi prèviament al tall per PS/ γ -secretasa (Gupta-Rossi et al., 2004).

El processament de substrats per PS/ γ -secretasa es produeix a partir de la interacció entre ambdós proteïnes en el lloc catalític de PS. En aquest punt el substrat es proteolitzat en el seu domini transmembrana en dos llocs principalment, anomenats lloc ϵ i lloc γ . El model de processament més acceptat descriu que el processament succeeix de forma seqüencial, on γ -secretasa talla primer en el lloc ϵ del substrat, el qual es troba en la zona de la membrana més pròxima al citoplasma. Aquest tall ϵ allibera un fragment intracel·lular, anomenat ICD, i deixa un fragment del substrat en la membrana. En aquest punt γ -secretasa proteolitza el fragment restant en la membrana cada tres aminoàcids al llarg del l'hèlix transmembrana, des del lloc ζ fins al lloc γ , fins que els pèptids generats són prou petits per ser alliberats de la membrana.

Processament d'APP per γ -secretasa

La proteïna APP, precursora del pèptid β -amiloide implicat en AD, és un dels substrats més estudiats del complex γ -secretasa. El processament d'APP pel complex γ -secretasa pot produir-se a través de dues vies, l'amiloidogènica i la no-amiloidogènica. La via no amiloidogènica s'inicia prop de la superfície cel·lular per la família de metaloproteases ADAM a partir dels seus membres ADAM10 o ADAM17 (TACE). Aquest primer processament per TACE redueix significativament l'ectodomini d'APP, sAPP α . El fragment d'APP resultant ancorat a la membrana, APP-CTF C83 es a continuació proteolitzat per PS/ γ -secretasa en el lloc ϵ , produint l'alliberament del fragment intracel·lular AICD. PS/ γ -secretasa també produeix un tall en el lloc γ del fragment APP que queda a la membrana, generant un pèptid p3 que s'allibera de la membrana.

La via amiloidogènica s'inicia a través de l'enzim β -secretasa (BACE1), el qual talla APP en la regió N-terminal prop de la zona on es produeix el tall per TACE. Aquest tall es produeix en la superfície cel·lular o un cop APP ha estat internalitzat en la cèl·lula per endocitosi. El tall per BACE1 allibera el fragment soluble sAPP β i genera un fragment ancorat la membrana anomenat APP-CTF C99. A continuació PS/ γ -secretasa processa APP-CTF C99 en el lloc γ generant diversos pèptids A β de longituds diferents, mentre que s'allibera el fragment AICD al citosòl.

3.2.3 Processament dels ectodominis dels substrats de γ -secretasa

Tan la via amiloidogènica com la no-amiloidogènica requereixen un processament previ a γ -secretasa dels ectodominis dels seus substrats. Aquests processos es duen a terme a través de proteases de membrana amb activitat α -secretasa o β -secretasa.

Les metaloproteases de membrana ADAMs són les responsables de l'activitat α -secretasa. Les ADAMs es caracteritzen per la presència de dominis d'aminoàcids conservats entre els quals hi ha una pèptid senyal per a la localització en membrana, un domini metaloproteic, un domini desintegrina, una regió rica en cisteïnes, un domini transmembrana i una cua citoplasmàtica. Les ADAMs es divideixen en dos grups, les que presenten activitat catalítica, amb un domini d'unió a Zn, i les que no tenen activitat. L'activitat catalítica de les ADAMs pot ser tan constitutiva com regulada per estímuls que involucren receptors acoblats a proteïna G, segons missatgers o Ca^{2+} intracel·lular. Les ADAMs més rellevants són ADAM10 i ADAM17, degut a la seva implicació en el processament de substrats com APP i Notch. ADAM10 és una metaloproteasa necessària per al desenvolupament embrionari, ja que la seva absència induïx la letalitat a etapes molt primerenques degut a defectes en el sistema nerviós central i el cor (Hartmann et al., 2002). Estudis d'expressió gènica demostren que en ratolins l'expressió d'ADAM10 és àmplia en el cervell, mentre que l'expressió d'ADAM17 té un patró més restrictiu. De fet ADAM17 s'expressa en poblacions concretes com són les cèl·lules piramidals del còrtex cerebral i en les cèl·lules de la capa granular de l'hipocamp (Kärkkäinen et al., 2000). Tot i que s'ha demostrat la generació de sAPP α a través d'ADAM17 (Buxbaum et al., 1998), diversos estudis demostren que el principal encarregat de l'activitat α -secretasa és ADAM10 (Kuhn et al., 2010). L'activitat α -secretasa es pot regular a partir de diversos mecanismes. La fosforilació d'ADAM17 a través d'ERK controla el tràfic i la maduració de la metaloproteasa (Díaz-Rodríguez et al., 2002). Per altra banda, la disminució del colesterol en la membrana plasmàtica induïx a un augment de l'activitat α -secretasa (Kojro et al., 2001). Per ADAM10, la regulació de la seva activitat es regula a partir de la seva presència en el compartiment postsinàptic. Per a que es produeixi aquesta situació es necessari que ADAM10 interacció amb la proteïna de càrrega SAP97, situació que es veu regulada positivament per l'activació de receptors de NMDA (Marcello et al., 2007).

L'altra activitat proteasa rellevant en el processament primari de substrats per γ -secretasa és l'activitat β -secretasa, la qual es duu a terme gràcies als enzims BACE1 i BACE2, essent BACE1 la principal responsable de l'activitat. Tot i que l'activitat β -secretasa està expressada àmpliament, la regió amb major activitat proteolítica és el cervell. BACE1 requereix un entorn àcidic per a la màxima eficiència de la seva activitat, per això localitza principalment en compartiments intracel·lulars àcids, orientant el seu centre actiu cap al lumen (Kinoshita et al., 2003). Els substrats de β -secretasa tenen com a requeriments ser proteïnes associades o unides a la membrana. A diferència de l'activitat γ -secretasa, el reconeixement per BACE1 dels seus substrats es produeix amb una alta especificitat de seqüència (Citron et al., 1995). Un exemple és el d'APP, que es processat per BACE1 només en els aminoàcids Asp⁺¹ i Glu⁺¹¹. Alguns estudis han suggerit que l'activitat BACE1 augmenta quan els substrats es troben juntament amb l'enzim en microdominis tipus *lipid raft* (Cordy et al., 2003). A part d'APP, altres substrats coneguts de BACE1 són el receptor tipus II d'interleuquina-1, el lligand-1 de la glicoproteïna P-selectina, o els homòlegs d'APP APLP1 i APLP2. En estudis

de cribratge es van identificar diversos candidats per a substrat de BACE1 entre els quals s'inclouïen els receptors EphA2, EphA4 i EphA7 (Hemming et al., 2009).

3.2.4 Vies de senyalització regulades per l'activitat PS/ γ -secretasa

Els productes intracel·lulars (ICDs) generats pel processament de substrats a través del complex PS/ γ -secretasa poden exercir, en alguns casos, una funció de senyalització independent a la exercida per la proteïna precursora sense processar.

Substrat	Funció substrat	ICD	Funció ICD
APLP1	sinaptogènesi	ALID1	regulació transcripcional Fe65/Tip60
APLP2	creixement neurític	ALID2	regulació transcripcional Fe65/Tip60
APP	adhesió cel·lular, creixement neurític	AICD	regulació transcripcional Fe65/Tip60
CD44	adhesió cel·lular	CD44-ICD	regulació transcripcional transformació cel·lular
DCC	guia axonal	DCC-ICD	regulació transcripcional creixement neurític
E-cadherina	adhesió cel·lular	E-Cad/CTF2	regulació transcripcional regulació d'unions adherents
EphA4	regulació negativa d'espines dendrítiques	EphA4-ICD	regulació positiva d'espines dendrítiques
EphB2	guia axonal, sinaptogènesi	EphB2/CTF2	finalització senyal EphB2
ephrinB1	interacció cèl·lula-cèl·lula	eB1ICD	regulació d'ephrinB1
ephrinB2	guia axonal	ephrinB2/CTF2	formació d'adhesions focals
ErbB4	proliferació, diferenciació, apoptosi	E4ICD	regulació transcripcional de p53, apoptosi, astrogènesi
IFNaR2	receptor d'interferó	IFNaR2-ICD	regulació de transcripció per STAT
IL-1R1	receptor interleuquina-1	IL-1R1-ICD	regulació via JNK per interleuquina-1
LAR	adhesió cel·lular, creixement neurític, sinaptogènesi	LICD	regulació de transcripció per β -catenina/TCF
LRP1	receptor de lipoproteïna	LRP1-ICD	mort cel·lular isquèmica
N-cadherina	adhesió cel·lular, sinaptogènesi	N-cad/CTF2	regulació transcripcional CBP
Na_v-β2	canal de sodi per voltatge	β 2-ICD	regulació d'adhesió cel·lular i migració
Nectina-1α	Formació de sinapsis i unions adherents	NE-ICD	remodel·lació d'unions cel·lulars
Notch1, -2, -3, -4	receptor de determinació cel·lular i	NICD	regulació transcripcional per CSL

manteniment cèl·lules mare			
p75^{NTR}	supervivència cel·lular, migració i guia axonal	p75-ICD	regulació transcripcional, apoptosi, potenciació senyalització Trk
Syndecan-3	creixement neurític, migració	SICD	regulació transcripcional, regulació CASK
VEGF-R1	angiogènesi	VEGF-R1-ICD	inhibició de l'angiogènesi

Taula I1 - Substrats del complex γ -secretasa que generen un fragment intracel·lular (ICD) amb activitat biològica coneguda. Adaptat de (Haapasalo and Kovacs, 2011).

Regulació transcripcional

Diversos ICDs de substrats de PS/ γ -secretasa presenten una localització nuclear i la capacitat de regular la transcripció. En el cas de AICD provinent d'APP, s'ha observat que es capaç d'unir-se a les proteïnes adaptadores Fe65 i Tip60 per translocar al nucli. Aquest mecanisme permetria a AICD regular la transcripció de gens com KAI1, GSK-3 β , neprilisina, p53 i APP (Kimberly et al., 2001; Rotz et al., 2004). Per altra banda, existeixen altres treballs que desmenteixen aquesta implicació degut a que no s'observen canvis efectius a nivell proteïc en diversos models (Hébert et al., 2006). Altres ICDs amb possible activitat transcripcional són CD44-ICD, DCC-ICD, NICD (Notch), E- i N-Cadherin-ICD, i receptors tirosina fosfatasa (RPTP) ICD.

Regulació del destí cel·lular

El receptor Notch i el seu fragment intracel·lular NICD estan involucrats en la regulació de processos de destinació cel·lular o manteniment de la població de cèl·lules mare durant el desenvolupament. El receptor ErbB4 també genera un fragment intracel·lular (E4ICD), el qual podria estar regulant transcripció gènica a través de diversos factors de transcripció, a la vegada que podria tenir un rol pro-apoptòtic (Vidal et al., 2005). L'expressió de proteïnes associades a la regulació per E4ICD també està associada amb els processos de mielinització durant la maduració d'oligodendrocits (Lai and Feng, 2004)

Regulació de mort cel·lular

El processament del receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LRP1), per PS/ γ -secretasa sembla estar implicat en la mort cel·lular durant processos d'isquèmia, a través de la translocació nuclear del fragment LRP1-ICD (Polavarapu et al., 2008). Per altra banda, el receptor de neurotrofines p75^{NTR} podria estar mediant apoptosi en neurones a través de la generació del fragment p75^{NTR}-ICD, quan aquest transloca al nucli associat al factor NRIF.

Regulació del creixement neurític i l'adhesió cel·lular

El receptor de membrana cel·lular DCC, activat per netrines, regula positivament el creixement axonal durant el desenvolupament. En oposició a aquesta funció, la producció d'un fragment DCC-ICD a través del processament per γ -secretasa, inhibeix el creixement neurític i regula negativament la senyalització del receptor DCC (Parent et al., 2005). De forma similar a l'efecte de DCC-ICD, la família dels receptors Eph i els seus lligands regula el creixement neurític, induint senyals de retracció en els cons de creixement. La unió de receptors EphB induïx la proteòlisi per PS/ γ -secretasa dels lligands ephrinB2 (Georgakopoulos et al., 2006). El fragment ephrinB2-ICD resultant pot activar la via Src quinasa induïnt processos de formació de protrusions de membrana. Per altra banda, EphA4-ICD regula la formació d'espines dendrítiques (Capítol 2 – Apartat 2.5), procés contrari al senyalitzat pel receptor no processat EphA4. En processos d'adhesió cel·lular PS/ γ -secretasa processa les E-cadherines i induïx la ruptura del complex E-cadherina- β -catenina, traduint-se en la pèrdua de les unions adherents en cèl·lules epitel·lials (Ito et al., 1999).

Tot i les funcions mostrades anteriorment per a la senyalització regulada per γ -secretasa, sembla ser que diversos autors discrepen del paper en senyalització dels fragments generats per PS/ γ -secretasa, i consideren que el paper d'aquest complex és més similar al d'un proteosoma per proteïnes de membrana. El fet que l'activitat γ -secretasa no tingui una especificitat per al lloc de tall en els substrats, que es produeixin diversos talls en la regió transmembrana, que s'observi un enriquiment del complex en membranes lisosomals, o que estigui formada per una proteïna catalítica i diverses proteïnes accessòries com el proteosoma, semblen motius suficients perquè diversos autors hipotetitzin que la funció real de PS/ γ -secretasa sigui mantenir l'homeòstasi de la membrana (Kopan and Ilgan, 2004)

3.2.5 Paper de la presenilina-1 en el desenvolupament del CNS

Les PS són elements essencials durant les etapes del desenvolupament del sistema nerviós central. Un de les vies de senyalització més conegudes és la que regula el processament de Notch. De fet, la senyalització de Notch és tan rellevant durant el desenvolupament en diversos teixits, que la seva desregulació en ratolins deficients per l'expressió de PS1 causa des d'anormalitats en la formació de l'esquelet fins a hemorràgies cerebrals, tot portant a la mort prematura durant l'etapa perinatal (Shen et al., 1997; Donoviel et al., 1999; Herreman et al., 1999). L'ús de ratolins *knockout* per PS ha permès demostrar diversos processos regulats per PS durant el desenvolupament del sistema nerviós. Un exemple és la pèrdua de progenitors neuronals i neurones en regions específiques en els ratolins deficients per PS1. Aquesta degeneració succeeix des de les capes més internes de la zona ventricular fins als ventricles laterals dels embrions (Shen et al., 1997; Handler et al., 2000), degut a que la pèrdua de PS1 condueix a un augment del nombre de neurones postmitòtiques diferenciades

a partir de les cèl·lules progenitores durant les etapes inicials de la neurogènesi. El resultat produeix la pèrdua parcial de la població de progenitors neuronals. Aquesta diferenciació neuronal prematura s'explica pel control de PS sobre la senyalització Notch i la regulació gènica associada a través dels gens *Hes1* i *Hes5*, la pèrdua dels quals induïx la maduració prematura de les neurones.

Per altra banda, els processos de neurogènesi també estan afectats en els ratolins deficientes per PS. Tot i que el nombre de progenitors neuronals és menor en els ratolins PS *knockout*, la raó principal pel descens en la neurogènesi és l'absència de senyalització Notch, la qual participa en el procés neurogènic, induïnt una hipertròfia del sistema nerviós. De la mateixa manera, la pèrdua de la senyalització PS1/Cdk-5 provoca defectes en la migració neuronal i la morfogènesi del sistema nerviós en el còrtex i el tronc encefàlic (Louvi et al., 2004). En etapes adultes, la inactivació condicional de PS1 i PS2 també condueix a una pèrdua de la memòria dependent de l'hipocamp i la plasticitat sinàptica, acabant en processos de neurodegeneració en els animals d'edats avançades (Saura et al., 2004). Aquests processos indiquen que les PS també estan involucrades en processos de supervivència neuronal i plasticitat sinpàtica.

3.3 Paper de PS/ γ -secretasa en la malaltia d'Alzheimer i altres patologies

Malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer (AD) és el tipus més comú de demència, essent la responsable del 50-60% de demències diagnosticades. Les conseqüències d'aquesta malaltia són la pèrdua de qualitats humanes essencials com la memòria, la personalitat, la comprensió, l'abstracció i el llenguatge. Per al correcte diagnòstic d'AD és necessari un estudi neuropatològic per tal de descartar altres demències similars. Concretament, el cervell dels pacients d'AD presenta un atròfia hipocampal i cortical i un augment dels ventricles. A nivell microscòpic, s'observa la disminució del nombre de cossos neuronals en el sistema límbic, en el còrtex associatiu, i també en els nuclis subcorticals que projecten a aquestes àrees.

Els principals signes distintius de la malaltia són els cabdells neurofibrilars (NFT), compostos per acumulacions de proteïna Tau hiperfosforilada; i l'augment de les plaques senils, formades majoritàriament per pèptid β -amiloide ($A\beta$) (Tanzi and Bertram, 2005). Ambdós tipus de lesions es troben àmpliament en l'hipocamp, el còrtex cerebral, l'amígdala i en alguns nuclis subcorticals. Els NFT estan compostos per filaments helicoïdals aparellats (PHF), dels quals la subunitat principal és la proteïna d'associació a microtúbuls Tau, hiperfosforilada de forma anormal. Tau, en la seva forma no patològica es troba de forma soluble en el citoplasma o associada a microtúbuls. La hiperfosforilació de Tau es duu a terme per diverses quinases desregulades durant la malaltia com són GSK-3 β o Cdk5, provocant que es torni insoluble i es dissociï dels microtúbuls agregant-se en PHF. A partir d'aquest punt, els NFTs es generen a partir de l'agregació de PHF acumulats en les

dendrites i els cossos axonals. Per altra banda, les plaques senils es troben rodejades per axons, dendrites i cèl·lules glials en degeneració. Les plaques senils es formen a partir de la nucleació dels pèptids A β 40 i A β 42, els quals són productes de la proteòlisi seqüencial de la proteïna APP per BACE1 i el complex PS/ γ -secretasa. Les alteracions aberrants en la producció del pèptid A β 42 respecte el pèptid A β 40, condueix a l'agregació d'aquests i la formació de les plaques senils, les quals produeixen toxicitat a les cèl·lules del sistema nerviós central.

Existeixen dues formes d'AD, la forma familiar i l'espòrica. La forma espòrica afecta a persones majors de 65 anys i representa més del 99% dels casos. Aquesta forma espòrica no està associada de forma clara a cap patró hereditari, tot i que existeixen factors de susceptibilitat com l'expressió del polimorfisme ϵ 4 de la lipoproteïna ApoE (Poirier et al., 1993). Per altra banda, la forma familiar d'AD (FAD) és una malaltia autosòmica dominant heretada que afecta a persones menors de 65 anys i representa aproximadament l'1% dels casos totals d'AD (Holtzman et al., 2011). La majoria dels casos de FAD són causats per mutacions en els gens de PS i APP. Actualment s'han descrit més de 160 mutacions per al gen PSEN1 i 10 mutacions per al seu homòleg PSEN2 (Tanzi and Bertram, 2005).

Mutació	A β 40	A β 42	NICD	AICD
PSEN1				
A79V	↓	=		
C92S			=	
Y115H			↓	
N135D	↓	↑		
I143T	↓	↑	↓	
M146L	=	↑	=	=
M146V	=	↑	↓	↓
H163R	=	↑		
L166P	↓	↑ / =	↓	↓
L166R			↓	↓
G206A	=	↑	↓	↓
G209V	=	↑	↓	=
I229F			=	↓
A231V	↓	=		
M233L			=	↓
M233T	↓	↑	=	↓
M233V			=	↓
F237I			=	↓
A246E	=	↑		
P264L	↓	↑		
L286V			=	
Δ 9	↓	↑ / =	↓	↓
G384A	↓	↑	↓	
L392V	=	↑	↓	↓
C410Y	↓	↑	↓	↓
PSEN2				

T122P	↓	↑ / =	↓	↓
N141I	↓	↑	↓	↓
M239V	↓	↑	=	↓
M239I	↓	↑	=	↓

Taula I2 - Taula resum de l'efecte de les mutacions lligades a Alzheimer familiar sobre la generació dels pèptids Aβ40, Aβ42, i els fragments intracel·lulars de Notch (NICD) i APP (AICD). L'augment de la generació s'indica amb "↑", la disminució "↓", i la no variació "=". Taula adaptada de (Shen and Kelleher, 2007).

Les mutacions en PS1 es localitzen en les regions transmembrana, els dominis més conservats. La majoria de les mutacions suposen un increment en la ratio de la producció del pèptid β-amiloide Aβ42 respecte del Aβ40, ja sigui per l'augment de producció de Aβ42 com per la disminució de la generació de Aβ40. Tot i la modificació del lloc de tall en el pèptid β-amiloide, encara no és clara l'afectació que produeixen les diverses mutacions de PS1 sobre el processament d'altres substrats per l'activitat γ-secretasa. En alguns casos es considera que les mutacions produeixen un guany de funció mentre que en d'altres es produeix una pèrdua de funció. De fet diversos estudis utilitzant mutacions familiars de PS1 han analitzat l'activitat catalítica de γ-secretasa a través dels pèptids intracel·lulars de substrats com Notch o APP, observant que la tendència general és la pèrdua parcial de funció (Bentahir et al., 2006; Shen and Kelleher, 2007).

Tumorogènesi

Per tal d'estudiar la tumorogènesi associada a PS1 ha estat necessari utilitzar aproximacions en ratolins transgènics que mantinguessin l'expressió de PS1 en el sistema nerviós central, combinant-la amb la delecció de l'expressió de PS1 en altres teixits. Un dels casos més significatius és el de la tumorogènesi en pell. Els ratolins deficients en PS per pell, en edats avançades presenten diversos tipus d'alteracions epitelials com hiperplàsia epidèrmica, hiperqueratosi i carcinomes escamosos (Xia et al., 2001). Aquests efectes són atribuïts a una alteració de la senyalització de la β-catenina, incrementant la seva presència citosòlica en l'epidermis (Tournoy et al., 2004). Aquestes alteracions sobre la senyalització de β-catenina també estan relacionats amb una alteració de la senyalització a través de Notch. La transformació neoplàsica de Notch requereix la via de senyalització Ras/MAPK (Weijzen et al., 2002) i el receptor d'EGF. Diversos treballs impliquen les PS tan en la regulació de la via de senyalització de MAPK, com en la senyalització i degradació del receptor d'EGF, els quals relacionen directament l'aparició de carcinomes de pell i la desregulació d'EGF per PS (Zhang et al., 2007; Rocher-Ros et al., 2010).

OBJECTIUS

Els objectius d'aquesta tesi doctoral han estat:

- Investigar el paper de PS1/ γ -secretasa en la diferenciació neuronal durant el desenvolupament
- Estudiar els mecanismes moleculars pels quals PS1/ γ -secretasa regula el creixement axonal en neurones hipocampals en cultiu
- Analitzar el paper d'EphA3 en la regulació del creixement axonal per les presenilines
- Examinar el paper de RhoA GTPasa en la regulació del creixement axonal mediada per PS1/ γ -secretasa i EphA3

MATERIALS I MÈTODES

Materials i mètodes

1. CULTIU CEL·LULAR

1.1 Línies cel·lulars

1.1.1 Tipus de línies cel·lulars

HEK 293T: Variació de la línia cel·lular de ronyó humà embrionari (HEK 293) que conté l'antígen T SV40.

MEF: Fibroblasts embrionaris immortalitzats. Fibroblasts de pell d'embrions de ratolins control (PS1/PS2) i deficients en presenilina-1 i presenilina-2 (PS^{-/-}), immortalitzats utilitzant l'antígen T SV40 ((de Strooper et al., 1998); (de Strooper et al., 1999)). Aquestes línies van ser cedides pel Dr. B. De Strooper (University of Leuven, Bèlgica).

SK-N-AS: Línia cel·lular de neuroblasts humans obtinguts a partir de la metàstasi en la mèdula òssia d'un pacient amb neuroblastoma.

1.1.2 Material de línies cel·lulars

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma Aldrich D5796) suplementat amb 2mM L-glutamina, 0.25 mg/ml penicil·lina i estreptomicina, i 10% de sèrum fetal boví (FBS; Gibco). En les cèl·lules MEF PS ^{+/+} i MEF PS ^{-/-} es va utilitzar 0.2 mg/ml de geneticina (G418; Gibco) com antibiòtic de selecció.

Tampó fosfat salí (PBS, 1x): 136.8 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.8 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM K₂HPO₄, pH 7.4.

Tripsina-EDTA (Gibco), Dimetilsulfòxid (DMSO; Sigma).

1.1.3 Manteniment de línies cel·lulars

Les línies cel·lulars van créixer en el medi de cultiu corresponent a una temperatura de 37°C i una atmosfera humida amb un 5% de CO₂. Les cèl·lules es van subcultivar dos cops per setmana realitzant dil·lucions 1/20 tal com es descriu en el següent protocol. Les cèl·lules es van rentar amb PBS prèviament escalfat, a continuació es va afegir 0.25% de tripsina-EDTA i es va incubar durant 3 minuts a 37°C en l'interior d'un incubador. La reacció es va aturar amb el medi de cultiu corresponent i les cèl·lules necessàries es van dil·luir amb medi de cultiu fresc per posteriorment ser sembrades.

Per a conservació a llarg termini, les cèl·lules van ser tripsinitzades i centrifugades (1.000 rpm, 5 min) i van ser resuspeses en 4.5 ml de medi de congelació (50% FBS, 40% DMEM, 10% DMSO). La suspensió cel·lular va ser transferida a criovials prèviament etiquetats. Les al·lquotes es van emmagatzemar a -80°C durant 2 setmanes i posteriorment es van transferir a un tanc de nitrogen líquid (-196°C).

1.1.4 Transfecció de línies cel·lulars

Per als experiments de transfecció transitòria, es van sembrar $1.2 \cdot 10^6$ cèl·lules en plaques de 60 mm o $2.2 \cdot 10^6$ cèl·lules en plaques de 100 mm, i es van mantenir a 37°C durant 24 hores. Per a la transfecció es va utilitzar una tècnica de formació de liposomes (Lipofectamine 2000; Invitrogen). Els complexos DNA-liposoma es van generar a partir de la incubació de 2µl de LipofectAMINE 2000 per cada 1µg de DNA, durant 20 min a temperatura ambient en medi OptiMEM (Gibco) suplementat amb L-glutamina (2 mM). Per a les plaques de 60 mm es van utilitzar 2 µg de DNA. Mentre que per les plaques de 100 mm es van utilitzar 6 µg de DNA. Les cèl·lules van ser rentades amb PBS i posteriorment es van incubar amb medi de cultiu OptiMEM/glutamina. Després de 20 minuts es van afegir els complexos DNA-liposoma en cada placa. El medi de transfecció es va mantenir durant 2 hores a 37°C, i posteriorment va ser substituït per medi de cultiu DMEM suplementat amb 10% FBS. L'expressió transitòria mitjançant DNA plasmídic es va dur a terme durant 48 hores abans de la lisi cel·lular.

1.1.5 Tractaments farmacològics

Inhibidors de γ -secretasa: *N*-[(3,5-Difluorofenil)acetil]-L-alanil-2-fenil]glicina-1,1-dimetil ester (DAPT) (250 nM; Sigma). (5S)-(tert-Butoxicarbonilamino)-6-fenil-(4R)-hidroxi-(2R)-benzilhexanoil)-L-leuci-L--fenilalaninamida (L-685.458) (10 µM; Tocris).

Activador de RhoA: 1-Oleoil-*sn*-glicerol 3-phosphate (LPA; 10 µM; Sigma)

1.2 Cultiu primari de neurones

1.2.1 Material de cultius primaris

Neurobasal / 10% FBS: Medi de cultiu Neurobasal (Gibco 211103.049) suplementat amb 10% FBS (Gibco), 2 mM L-glutamina i 0.25 mg/ml penicil·lina/estreptomicina. Aquest medi va ser utilitzat només per a la sembra i adhesió de les cèl·lules.

Neurobasal / B-27: Medi de cultiu Neurobasal suplementat amb B-27 (Invitrogen; 17504-044), 2 mM L-glutamina i 0.25 mg/ml penicil·lina/estreptomicina. Aquest medi va ser utilitzat per al manteniment del cultius primaris de neurones.

PBG: PBS (1x) suplementat amb 0.6% de glucosa i 0.25 mg/ml de penicil·lina/estreptomicina.

DNAsa: Es dilueixen 1000 unitats de DNAsa (Sigma) per ml en HBSS (Gibco 14175-053), es filtra posteriorment i s'emmagatzema a -20°C .

Tripsina: Tripsina al 2,5% (Gibco 15090-046).

Sèrum normal de cavall (NHS; Gibco 16050-122)

Cobreobjectes tractats amb poly-D-lisina: Per als experiments d'immunofluorescència les neurones van ser sembrades en cobreobjectes de 12 mm i tractats amb 0.15 mg/ml poly-D-lisina (Sigma; P7658) en aigua estèril. Per als assajos bioquímics les neurones es van sembrar en plaques de 60 mm, prèviament tractades amb 0.05 mg/ml de poly-D-lisina. Després de 24 h d'incubació a 37°C , els cobreobjectes van ser rentats dues vegades amb PBS.

1.2.2 Cultiu primari de neurones PS1^{-/-}

Les neurones hipocampals o corticals presenilina-1 *knockout* (PS1^{-/-}) es van obtenir de ratolins PS1^{-/-} al creuar ratolins heterozigots PS1^{+/-} (*background* mixt C57BL/6 129/Sv). Degut a la presència de diferències fenotípiques significatives en els embrions PS1^{-/-} a estadi embrionari E15.5, tals com l'absència de desenvolupament en la cua, la presència d'hemorràgies cerebrals en un o ambdós hemisferis i una menor mida de l'embrió, vam poder classificar en el moment del cultiu primari els ratolins PS1^{+/+} o PS1^{+/-} com a controls, o els PS1^{-/-}. El genotip es va confirmar posteriorment per PCR (Mètodes 3.2). Les neurones hipocampals i corticals *wild-type* es van obtenir de creuaments de ratolins C57BL/6.

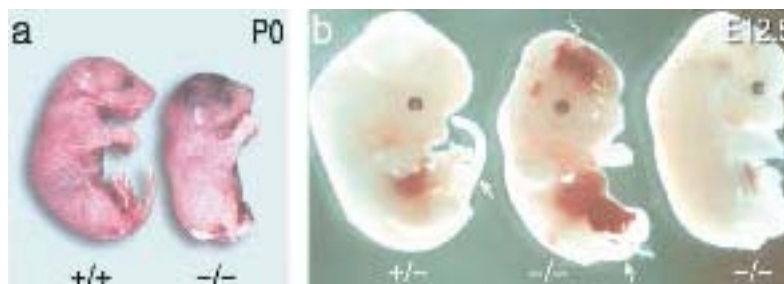


Figura M1 - Diferències fenotípiques d'embrions de ratolins mutants per PS1. (Shen et al., 1997)

Degut a la letalitat de la delecció de PS1, es van obtenir neurones hipocampals i corticals a partir d'embrions E15.5 provinents de creuaments entre ratolins PS1^{+/-}. Després de decapitar els embrions, es va extreure el cervell, separar els hemisferis i es van eliminar les meninges per tal d'evitar la presència de fibroblasts. Es va disseccionar el còrtex o l'hipocamp i es va incubar

en tampó PBG amb una solució de 0.05% de tripsina durant 8-10 minuts. La reacció de tripsinització va ser bloquejada amb sèrum de cavall i es va afegir una solució de DNAsa (100U/ml) per degradar el DNA. El teixit dissociat es va centrifugar ($250 \times g$ 3 min) i va ser resuspès en PBG fresc. Finalment, les cèl·lules obtingudes van ser digerides mecànicament amb una pipeta Pasteur i centrifugades ($250 \times g$ 5 min). El sobrenedant va ser eliminat i el precipitat cel·lular resuspès amb Neurobasal suplementat amb FBS. Les cèl·lules obtingudes van ser comptades en una cambra de Neubauer. Les neurones van ser sembrades a una densitat final de $1.6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² en plaques de 24 pous, per a estudis de morfologia axonal, que contenien cobreobjectes prèviament tractats amb poly-D-lisina, o a una densitat de $4.5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² en plaques de 60 mm, per a estudis bioquímics, i incubades a 37°C en un ambient humit amb un 5% de CO₂. Passades dues hores després de sembrar les neurones, es va substituir el medi de sembrat per medi de cultiu, Neurobasal suplementat amb B-27 i van ser mantingudes durant 4 dies *in vitro* (DIV) en un incubador a 37°C en un ambient humit i un 5% de CO₂.

1.2.3 Tractaments farmacològics

Inhibidor de metaloproteases de matriu: N-[(2R)-2-(Hidroxiamidocarbonilmetil)-4-metilpentanoil]-L-triptofan Metilamida (GM6001) (10 µM; Calbiochem). Les neurones en cultiu van ser tractades en el mateix dia de cultiu (DIV 0), afegint l'inhibidor sobre el medi de cultiu després de l'adhesió cel·lular. L'inhibidor va ser renovat passades 48 h afegit sobre el medi de cultiu condicionat.

Inhibidor de γ -secretasa: N-[(3,5-Difluorofenil)acetil]-L-alanil-2-fenil]glicina-1,1-dimetil ester (DAPT) (250 nM; Sigma). Les neurones en cultiu van ser tractades en el mateix dia de cultiu (DIV 0) afegint l'inhibidor sobre el medi de cultiu després de l'adhesió cel·lular. L'inhibidor va ser renovat passades 48 h afegit sobre el medi de cultiu condicionat.

Inhibidor de ROCK-1: trans-4-[(1R)-1-Aminoetil]-N-4-piridinilciclohexancarboxamida dihidroclorur (Y27632) (10 µM; Calbiochem). Les neurones en cultiu van ser tractades a 2 DIV amb l'inhibidor Y27632, amb l'objectiu de bloquejar la via de senyalització de RhoA. L'inhibidor es va afegir sobre el medi de cultiu condicionat.

1.2.4 Transfecció de neurones

Per tal de transfectar les neurones corticals o hipocampals es va utilitzar la tècnica de formació de liposomes (LipofectAMINE 2000; Invitrogen). Els complexos DNA-liposoma es van generar a partir de la incubació de 0,7 µl de Lipofectamine per cada 1 µg de DNA, durant 20 min a temperatura ambient en medi OptiMEM (Gibco) suplementat amb L-glutamina (2 mM). En el cas de les plaques de 24 pous, cada pou va ser transfectat amb 1 µg de DNA. En el cas de les

plaques de 60 mm, cada placa va ser transfectada utilitzant 6 µg de DNA. Per tal de preservar la viabilitat dels cultius primaris de neurones, es va mantenir la meitat del medi de cultiu condicionat en un tub a 37°C i les neurones es van mantenir amb la meitat restant del medi de cultiu condicionat durant la incubació amb els complexos liposoma-DNA. El medi de transfecció es va mantenir durant 1 h i 15 min, que posteriorment va ser descartat. Les cèl·lules van ser incubades amb medi de cultiu compost per un 50% de medi de cultiu condicionat i un 50% de medi de cultiu fresc. L'expressió transitòria mitjançant DNA plasmídic es va dur a terme durant 48 h.

1.2.5 Infecció de neurones amb lentivirus

Els cultius primaris de neurones es van infectar amb lentivirus simultàniament al procés de sembra. Les partícules lentivirals es van afegir en el tub amb les neurones disgregades en medi de cultiu (Neurobasal/10%FBS) i a continuació es van sembrar les cèl·lules en les plaques corresponents. La incubació dels virus es va realitzar durant 5 h, durant el procés d'adhesió de les cèl·lules sobre la placa, i posteriorment el medi de cultiu va ser descartat i substituït per medi de cultiu fresc (Neurobasal/B27).

1.2.6 Tractament farmacològic amb ephrin-A5-Fc

Per als experiments d'activació del receptor EphA3 es va utilitzar la proteïna quimèrica humana ephrin-A5 Fc (R&D Systems; 374-EA). Ephrin-A5 Fc és una proteïna de fusió entre el fragment constant (Fc) de la IgG humana i la regió C-terminal del lligand ephrin-A5. Per tal d'obtenir la màxima activació del receptor EphA3 és necessari fer-ho en forma de clúster (Wimmer-Kleikamp, 2004), per tant és necessari unir múltiples lligands ephrin-A5 prèviament a l'estímul. El mètode *in vitro* utilitzat per obtenir els clústers de lligand va ser la incubació d'un anticòs contra la Fc humana (Jackson Immunoresearch; 109-001-008) junt amb la proteïna recombinant ephrin-A5 Fc. La formació de clústers, prèvia a l'estímul, es va obtenir incubant ephrin-A5 Fc i anticòs contra Fc en una ratio 1:10 molar (lligand:anticòs), durant 20 min en agitació a temperatura ambient. Per tal d'aconseguir la màxima activació dels receptors d'EphA3, es van afegir sobre les cèl·lules els clústers d'ephrin-A5 Fc-IgG en una concentració de 0.18 ng/mm² (Lawreson et al., 2002). Els temps d'estímul per experiments d'activitat RhoA van ser de 0, 2 i 5 minuts, i per als experiments de creixement axonal van ser de 0 - 48 h.

2. MÈTODES BIOQUÍMICS

2.1 Immunoprecipitació i coimmunoprecipitació

Per als experiments d'immunoprecipitació i coimmunoprecipitació les cèl·lules es van cultivar en plaques de 100 mm (HEK293T: $2.1 \cdot 10^6$ cèl·lules/placa; Neurones: $3.5 \cdot 10^6$ cèl·lules/placa) i es

van resuspendre amb 500 µl de tampó de lisi d'immunoprecipitació per cada placa a 4°C. A continuació les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS a 4°C. Els lisats cel·lulars van ser disgregats mecànicament amb un homogeneïtzador tipus *Potter* i es van centrifugar (10.000 rpm, 10 min, 4°C). Es va descartar el precipitat i es va transferir el sobrenedant a un nou tub. En els experiments de co-immunoprecipitació sempre es van utilitzar lisats frescos per tal d'evitar perdre interaccions proteïna-proteïna per la congelació de les mostres.

Per immunoprecipitar la proteïna d'interès es van incubar per cada condició 300 µg o 1 mg de proteïna, de cultius de neurones hipocampals o línies cel·lulars, respectivament, juntament amb anticòs purificat (2-5 µl) i es va portar a un volum final de 750 µl amb tampó de lisi d'immunoprecipitació, durant tota la nit a 4°C en agitació circular. El dia següent, es van afegir 30 µl de proteïna G (Pierce), per anticossos monoclonals, o proteïna A (Thermo), per anticossos policlonals, i es va incubar durant 2 h a 4°C en agitació circular. Els immunocomplexes es van purificar per centrifugació (4000 rpm, 3 min, 4°C). Els sobrenedants van ser descartats i es va afegir 1 ml de tampó de lisi d'immunoprecipitació sobre els immunocomplexes deixant en agitació circular a 4°C durant 10 min, amb l'objectiu d'eliminar les unions inespecífiques tan de l'anticòs purificat com de la proteïna G o A als lisats cel·lulars. Els immunocomplexes es van centrifugar de nou (4000 rpm, 3 min, 4°C) i es van dur a terme 2 rentats més amb tampó de lisi amb quantitats decreixents de detergent NP-40, 0,5% (durant 10 min) i 0,1% (durant 5 min) respectivament. Finalment, el precipitat que contenia els immunocomplexes va ser resuspès en 25 µl de tampó de càrrega (2x) per a electroforesi.

Tampó de lisi d'immunoprecipitació: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM PMSF, inhibidors de proteases i fosfatases (Roche).

2.2 Electroforesi i Western blotting

2.2.1 Lisat cel·lular i determinació de proteïna

Les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS fred (4°C) per tal d'eliminar les restes de medi de cultiu, i a continuació van ser lisades amb tampó de lisi *RIPA-DOC* fred (4°C) suplementat amb inhibidors de proteases i fosfatases (Roche). Per a les neurones hipocampals en plaques de 60 mm es van lisar en 50 µl de tampó de lisi, mentre que les línies cel·lulars en plaques de 100 mm es van lisar en 100 - 200 µl de tampó de lisi. Els lisats cel·lulars van ser sonicats durant 15 s a un 30% de potència (Dynatech Sonic dismembrator – Model 300). La concentració de proteïna va ser determinada utilitzant un kit de quantificació colorimètric d'àcid bicinconínic (BCA) seguint les instruccions del fabricant (Pierce #23225).

Tampó de lisi RIPA-DOC: 50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% deoxicolat sòdic, 0.1% SDS, 1 mM Na₃VO₄, PMSF, suplementat amb inhibidors de proteases i fosfatases.

2.2.2 Electroforesi SDS-PAGE i transferència de proteïna

Els lisats cel·lulars es van dil·luir en tampó de càrrega (3x) i es van escalfar a 55°C o 95°C durant 5 minuts. Un marcador de pes molecular es van afegir per identificar les proteïnes d'interès (Protein Benchmark 10748-010; Invitrogen). Es van utilitzar gels de poliacrilamida (PAGE) amb densitats en un rang d'entre 7,5-12,5 % depenent de la resolució requerida i el pes molecular de la proteïna d'interès. L'electroforesi es va dur a terme a temperatura ambient a un amperatge constant (20 mA per gel) i un voltatge màxim. Un cop finalitzada l'electroforesi les proteïnes separades en el gel de poliacrilamida es van transferir a una membrana de PVDF (Bio-Rad), prèviament activada amb metanol. Finalment, les membranes ja transferides van ser tenyides de manera transitòria amb Ponceau S (Fluka) per tal de verificar la presència de proteïna. La tinció amb Ponceau S es va eliminar amb rentats d'aigua destil·lada i TBS.

2.2.3 Detecció de proteïnes per Western blotting

Per tal d'evitar les interaccions inespecífiques entre proteïnes a les membranes de PVDF, es va incubar una solució de bloqueig durant 30 min en les membranes ja transferides. Després de la incubació amb la solució de bloqueig les membranes es van rentar 3 vegades durant 10 min amb tampó TBS. A continuació, les membranes es van incubar amb anticòs primari, diluït en tampó d'anticòs, en agitació orbital durant 2 h a temperatura ambient o durant tota la nit a 4°C. Les membranes es van rentar 3 vegades (10 min cada rentat) amb tampó TBS-Tween 0.1% (TBS-T). Després, les membranes es van incubar amb anticòs secundari conjugat a peroxidasa de rave (HRP; 1:3000; Pierce) diluït en tampó de bloqueig, en agitació orbital a temperatura ambient durant 45 min. Per últim, les membranes es van rentar 3 vegades durant 10 minuts amb TBS-T. Les proteïnes d'interès van ser detectades sobre films per radiografia a partir d'una reacció quimioluminescent utilitzant Luminol (Sigma).

Per tal d'incubar més d'un anticòs sobre la mateixa membrana, aquesta va ser sotmesa a un procés de *stripping* consistent en la incubació durant 10 min d'una solució de *stripping* per tal d'eliminar els anticòs primaris i secundaris incubats prèviament. Després d'incubar durant 10 min la membrana es va rentar 2 vegades amb PBS (10 min cada rentat), i posteriorment es va rentar 2 vegades amb TBS-T (5 min cada rentat). La membrana es va bloquejar novament amb solució de bloqueig, deixant-la preparada per incubar un nou anticòs primari.

Material utilitzat en l'electroforesi, transferència i Western Blotting

TBS (1X): 20 mM Tris base, 137 mM NaCl, pH7.4

Materials i mètodes

Tampó d'electroforesi SDS-PAGE (10x): 250 mM Tris base, 2 M glicina, 1% SDS, pH8.3

Tampó de transferència (20x): 200 mM Tris base, 2 M glicina, pH8.3

Solució de bloqueig: 5% de llet sense greix en TBS-T

Tampó d'anticòs: TBS, 0.1% albúmina bovina (BSA), 0.02% thimerosal

Tampó de càrrega (1x): 62.5 mM Tris HCl (pH 6.8), 10% glicerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 0.01% blau de bromofenol.

Solució de *stripping*: 0.2 M glicina, 0.1% SDS, 1% Tween20, pH2.2

Anticòs	Proveïdor	Referència	Hoste	Dil·lució i aplicació			
				WB	IP	ICC	IHC
Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11029 A11008	ratolí conill	-	-	1:400	1:400
Alexa Fluor 555	Invitrogen	A21429	conill	-	-	1:400	1:400
Alexa Fluor 594	Invitrogen	A11032 A11037	ratolí conill	-	-	1:400	1:400
Alexa Fluor 594-fal·loïdina	Invitrogen	A12381	-	-	-	1:20	-
APP CTF	Dr. Saeko	-	ratolí	1:7500	-	-	-
β -actina	Sigma	T7816	ratolí	1:60.000	-	-	-
CrkII	BD Biosciences	610035	ratolí	1:5.000	5 μ l	-	-
Doublecortin	Abcam	ab18723	conill	-	-	-	1:1000
EphA3 C19	Santa Cruz	sc-919	conill	1:1000	5 μ l	1:200	1:200
EphA3 H80	Santa Cruz	sc-25456	conill	-	-	1:200	1:200
ErbB2	Santa Cruz	sc-284	ratolí	1:1000	-	-	-
Flag [FG4R]	Abcam	ab127420	ratolí	-	10 μ l	-	-
IgG-Fc	Jackson Immunoresearch	109-001-008	cabra	-	-	-	-
LaminB1	Zymed	33-2000	ratolí	1:1000	-	-	-
MAP2	Sigma	M9942	ratolí	-	-	1:300	1:800
N-Cadherin	Bd Biosciences	610921	ratolí	1:4000	-	-	-
Nestin	Dr. Susan Hockfield	-	ratolí	-	-	-	1:200
NeuN	Chemicon	MAB377	ratolí	-	-	-	1:1000
Presenilin-1	Cell signaling	5643	conill	-	2 μ l	-	-
Presenilin-1 loop	Calbiochem	AB5308	conill	1:4000	-	-	-
Presenilin-1 APS11	Abcam	ab15456	ratolí	-	-	1:200	1:200
PSD-95	Cell Singal	2507	conill	-	-	1:400	-
Sinaptofisina [SY38]	Abcam	ab8049	ratolí	-	-	1:800	-
SMI312	Covance	SMI-312R	ratolí	-	-	1:1000	1:500

Tau-1	Millipore	MAB3420	ratolí	-	-	-	1:400
-------	-----------	---------	--------	---	---	---	-------

Taula M1 – Anticossos primaris utilitzat per Western blotting (WB), immunoprecipitació (IP), immunofluorescència de cèl·lules en cultiu (ICC) i immunofluorescència en teixit (IHC).

2.3 Assaig d'activitat RhoA

Per mesurar l'activitat RhoA es van sembrar neurones hipocampals en plaques de 60 mm. Les cèl·lules es van deixar créixer durant 4 DIV i posteriorment es van lisar en 60 µl del tampó de lisi que proveït pel fabricant. Els lisats cel·lulars es van congelar a l'instant amb isopentà refrigerat en neu carbònica i emmagatzemat a -80°C. Es va determinar la concentració de proteïna separant 10 µl de lisat cel·lular abans de congelar les mostres, utilitzant el reactiu proveït pel fabricant (Precision Red Advanced Protein Assay). L'activitat RhoA es va determinar utilitzant la mateixa quantitat de proteïna total per mostra amb un kit de luminescència G-LISA (Cytoskeleton #BK124) seguint les instruccions del fabricant. Aquest kit consisteix en un assaig ELISA basat en l'afinitat de la proteïna RhoA activa amb la proteïna Rhoquina que es troba unida covalentment en una placa de 96 pous. La detecció quantitativa posterior de RhoA es duu a terme amb un anticòs primari per RhoA i un anticòs secundari conjugat a HRP.

2.4 Fraccionament subcel·lular

Per a l'obtenció de fraccions nuclears les cèl·lules en cultiu es van rentar dues vegades amb PBS fred (4°C) per tal d'eliminar les restes de medi de cultiu, i a continuació van ser resuspeses en tampó de fraccionament. Els lisats cel·lulars es van disgregar mecànicament amb un homogeneïtzador tipus *douncer*. Els homogenats es van centrifugar (1300 x g, 4°C, 15 min), i els precipitats, corresponents als nuclis, es van rentar dues vegades amb tampó de fraccionament. Els nuclis finalment es van resuspendre amb tampó de lisi nuclear i es van sonicar durant 15 s.

Tampó de fraccionament: 25 mM HEPES pH 7.4, 250 mM sacarosa, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, i suplementat amb inhibidors de proteases i fosfatases.

Tampó de lisi nuclear: 25 mM Tris HCl, pH 7.4, 250 mM NaCl, 1% NP40 i 10% glycerol, suplementat amb inhibidors de proteases i fosfatases.

2.5 Assaig d'activitat γ-secretasa

Els assajos d'activitat γ-secretasa es van dur a terme seguint les indicacions de treballs previs (M. Sastre et al. 2001). Cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb el constructe pEFBos-EphA3 o diversos constructes amb mutacions d'EphA3 i a les 48 h van ser lisades amb un tampó hipotònic. Els lisats cel·lulars es van disgregar mecànicament utilitzant un homogeneïtzador tipus *douncer* i a continuació es van centrifugar (1000 x g, 15min, 4°C). Els precipitats es van tornar a centrifugar (16.000 x g, 20 min), i es van resuspendre en tampó d'assaig. Els homogenats obtinguts corresponents a una fracció de membranes no purificada,

es van tractar amb vehicle (DMSO), o DAPT quan fou necessari i es van incubar a 37°C en agitació durant 0 - 2 h. Els homogenats es van centrifugar (100.000 x g, 1h) i es van obtenir dues fraccions, el sobrenedant (S100), corresponent a la fracció soluble, i el precipitat (P100) corresponent a la fracció no soluble.

Tampó hipotònic de lisi: 10 mM MOPS pH 7.0, 10 mM KCl, suplementat amb inhibidors de proteases.

Tampó d'assaig: 150 mM citrat sòdic pH 6.4, suplementat amb inhibidors de proteases.

2.6 Anàlisi per espectrometria de masses

Per als anàlisis d'espectrometria de masses es van sembrar $4,25 \cdot 10^6$ cèl·lules HEK293T en plaques de 150 mm de diàmetre. Després de 24 h les cèl·lules van ser transfectades transitòriament amb vector pcDNA3.1-3xFlag o el constructe d'EphA3 ICD-3xFlag mitjançant el mètode del fosfat càlcic (Mètodes – apartat 3.3). Després de 48 h d'expressió les cèl·lules van ser resuspeses amb tampó d'immunoprecipitació i els lisats van ser co-immunoprecipitats (Mètodes – apartat 2.1) utilitzant anticòs contra l'epítip Flag (DYKDDDDK). El resultat de la co-immunoprecipitació va resolt per electroforesi en un gel de poliacrilamida del 9%, i a continuació el gel va ser tenyit amb un reactiu basat en la tinció de Coomassie coloidal (Instant Blue; Expedeon) durant 1 h a temperatura ambient en agitació. Posteriorment es va retirar la tinció d'Instant blue i es va rentar el gel cada 10 min durant 1 h. Un cop identificades les bandes diferencials, vam retallar les bandes presents en EphA3 ICD-3xFlag però no en el control. Les bandes obtingudes es van analitzar per d'espectrometria de masses MALDI-TOF (Servei de Proteòmica UAB – ProteoRed-ISCIII). El protocol dut a terme va ser, primer la destinció de les bandes purificades amb bicarbonat amònic 50 mM / acetonitril 50%, després la reducció amb DTT 25 mM durant 20 min a 37°C. A continuació es va realitzar una alquilació amb iodoacetamida 25 mM durant 30 min a 37°C, i després es va realitzar la digestió amb tripsina amb 25 ng/mostra durant 5 h a 37°C. Finalment es va realitzar l'elució dels fragments de la digestió amb aigua, acetonitril 50% i àcid trifluoracètic 0.1%. Per a l'anàlisi MALDI-TOF es va utilitzar un equip MALDI-TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics). Els patrons dels fragments obtinguts van ser identificats a través de la base de dades NCBI i el motor de cerca Mascot.

3. MÈTODES DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.1 Amplificació i purificació de DNA

Transformació i creixement de bacteris

La transformació de bacteris es va dur a terme incubant 1 µg de DNA plasmídic purificat en 30 µl de bacteris E. coli DH5α químicament competents (Invitrogen) a 4°C durant 30 minuts. A continuació, els bacteris es van sotmetre a un xoc tèrmic a 42°C durant 45 s i es van incubar

immediatament a 4°C durant 10 min. Seguidament, els bacteris es van resuspendre en 800 µl de medi de cultiu *Luria Broth* (LB) i es van incubar en agitació orbital a 200 rpm durant 45 min a 37°C. Els bacteris ja transformats es van sembrar en plaques d'ampicil·lina (80 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml) en plaques d'agar a 37°C durant tota la nit. Al dia següent, es va seleccionar una colònia positiva de la placa i es va posar a créixer en 3 ml de medi LB amb antibiòtic de selecció a 37°C en agitació orbital durant 8 h. Per a les purificacions a gran escala de cultius bacterians, es van transferir els 3 ml del cultiu bacterià a un volum de 250 ml de medi LB amb antibiòtic de selecció i es va deixar creixent durant tota la nit en les mateixes condicions de temperatura i agitació. El dia següent, els bacteris van ser concentrats per centrifugació a 250 x *g* durant 15 min i van ser lisats per poder obtenir la purificació del DNA plasmídic d'interès.

Miniprep

Cultius bacterians de petita escala (3 ml) crescuts durant tota la nit, es van centrifugar durant 2 min a 10.000 x *g*. El sobrenedant es va descartar i el DNA plasmídic es va aïllar del precipitat cel·lular utilitzant una columna de purificació QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. El DNA purificat es va resuspendre en H₂O milliQ autoclavada. El DNA purificat es va tenyir amb SYBR-safe (Invitrogen), es va sotmetre a una electroforesi en gel d'agarosa i es va visualitzar per exposició a llum ultravioleta. Per quantificacions més precises, 1 µl de DNA purificat es va sotmetre a una quantificació fluorimètrica utilitzant el kit de quantificació Quant-It (Invitrogen). El DNA plasmídic purificat es va emmagatzemar a -20°C.

Maxiprep

Per a purificacions de grans quantitats de DNA plasmídic, els cultius bacterians de gran escala (250 ml) crescuts tota la nit es van centrifugar, el precipitat cel·lular es va lisar i el DNA plasmídic es va obtenir utilitzant columnes QiaFilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. El DNA purificat es va resuspendre en H₂O milliQ autoclavada i posteriorment es va quantificar el rendiment utilitzant el kit de quantificació Quant-It (Invitrogen). El DNA plasmídic purificat es va emmagatzemar a -20°C.

Materials de cultiu de bacteris

Luria Broth (LB): 25 g de LB (Invitrogen) dissolts en 1 litre d'aigua destil·lada, pH 7.4. La solució es va esterilitzar mitjançant un autoclau.

Plaques d'agar: 32 g d'agar (Invitrogen) dissolts en 500 ml de medi de cultiu LB i esterilitzats utilitzant un autoclau. La solució es va deixar refredar fins a 40°C abans d'afegir els antibiòtics de selecció (ampicil·lina o kanamicina). A cada placa de petri es va afegir un volum final de 20 ml de solució d'agar.

3.2 Purificació de DNA genòmic i genotipatge dels ratolins PS1^{-/-}

La purificació de DNA genòmic es va fer a partir de mostres de teixit de la cua dels ratolins. Un fragment de 2 mm de cua es va digerir amb proteinasa K (0.1 mg/ml; Roche) en 0.5 ml de tampó de lisi durant tota la nit a 56°C en agitació orbital contínua. El DNA genòmic de cada mostra es va precipitar amb 0.5 ml de 2-propanol (Baker) i es va centrifugar a 9250 x g durant 10 min. El precipitat es va rentar amb etanol al 70% i es va precipitar de nou per centrifugació durant 10 min a 15.000 x g. El precipitat obtingut es va resuspendre en tampó TE i es va deixar dissolent durant 2 h a 65°C.

Tampó de lisi per genotipatge: 100 mM Tris HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl

Tampó TE: 10 mM Tris HCl pH 8.5, 1 mM EDTA

La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) va ser utilitzada per al genotipatge dels ratolins deficient en PS1. Per comprovar la delecció específica de PS1, vam comprovar durant el genotipatge la presència de PS2 en els ratolins analitzats. Les condicions per a la PCR van ser les següents:

Gen	Inicialització	Desnaturalització	Encebador	Extensió	Extensió final
PS1	94°C, 4 min	94°C, 1min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 1 min
PS2	94°C, 4 min	94°C, 1min	65°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 1 min

Taula M2 – Condicions de PCR utilitzades per a l'amplificació dels gens Psen1 i Psen2 per al genotipatge de ratolins PS1^{+/+} i PS1^{-/-}.

Gen	Encebador	Seqüència	T°H (°C)	Cicles
PS1	P139	5' GGT TTC CCT CCA TCT TG GTT G 3'	60	40
	P140	5' TCA ACT CCT CCA GAG TCA GG 3'	60	40
	P158	5' TGC CCC CTC TCC ATT TTC TC 3'	60	40
PS2	P162	5' CAT CTA CAC GCC CTT CAC GG 3'	65	35
	P163	5' CAC ACA GAG AGG CTC AAG ATC 3'	65	35
	P164	5' AAG GGC CAG CTC ATT CCT CC 3'	65	35

Taula M3 – Seqüències dels primers utilitzats en les amplifacions per PCR dels gens Psen1 i Psen2 per al genotipatge de ratolins PS1^{+/+} i PS1^{-/-}.

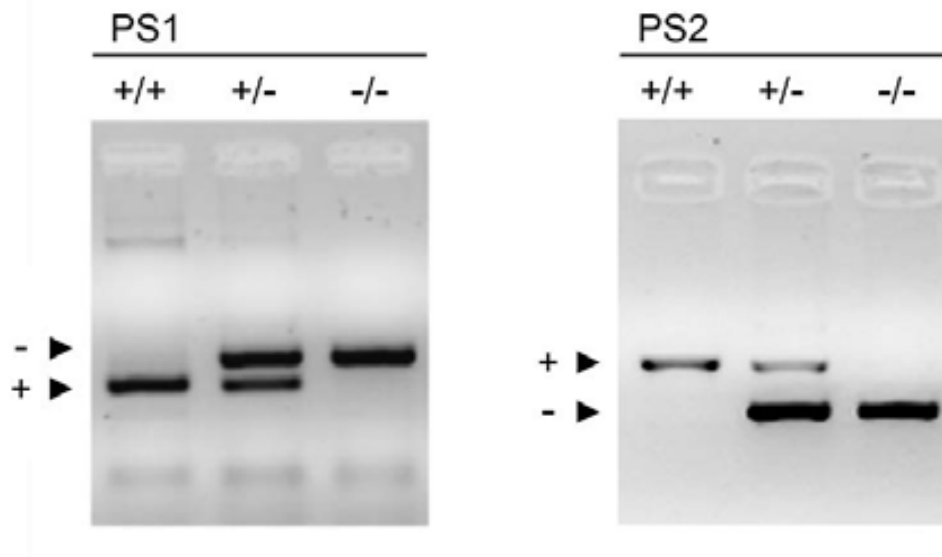


Figure M2 – Amplificació per PCR de gen Psen1 d’embrions de ratolí control PS1^{+/+}, heterozigot PS1^{+/-} i *knockout* PS1^{-/-}

3.3 Generació de RNA d’interferència *short-hairpin*

La tècnica del RNA d’interferència *short-hairpin* es va utilitzar per inactivar l’expressió del gen del receptor d’EphA3. La seqüència del RNA d’interferència es va dissenyar utilitzant el programari siDESIGN@Center *Dharmacon RNAi Technologies* software (<http://www.thermoscientificbio.com/design-center/>, Thermo Scientific). Es va escollir una seqüència a partir de la llista de candidats obtinguda, i per altra banda es va dissenyar una seqüència a l’atzar com a control negatiu (scramble). També es va comprovar utilitzant la base de dades BLAST (NIH) que les seqüències escollides no interferissin amb cap altre gen en *mus musculus*. Cada seqüència de RNA d’interferència, consistent en 19 nucleòtids dissenyats contra la seqüència de mRNA del gen EphA3 per *mus musculus* (GenBank, NM_010140.3), va ser insertada en una altra seqüència predissenyada de 60 nucleòtids, la qual conferia l’estructura de *short-hairpin* (shRNA) a la seqüència de RNA d’interferència i dianes de restricció.

Gen	Oligonucleòtid	Seqüència
EphA3	Forward	5'-gatccccGGGAATGCTCCGTGGGATAttcaagagaTATCCCACGGAGCATTCCCttttt-3'
	Reverse	5'-agctaaaaaGGGAATGCTCCGTGGGATAtctctgaaTATCCCACGGAGCATTCCCggg-3'
Scr	Forward	5'-gatcCCCGGAGAGCGTAGCGACTGTTtcaagagaAACAGTCGCTACGCTCTCCttttt-3'
	Reverse	5'-agctaaaaaGGAGAGCGTAGCGACTGTTtctctgaaAACAGTCGCTACGCTCTCCggg-3'

Taula M4 – Seqüències dels oligonucleòtids de cadena simple complementaris per als shRNA EphA3 i scramble.

Els oligonucleòtids amb la seqüència shRNA es van hibridar per generar DNA de doble cadena, utilitzant un tampó d'*annealing* seguint el següent protocol: 4 min a 95°C, 10 min a 70°C, 10 min a 50°C, 10 min a 37°C, 5 min a 20°C i 5 min a 4°C. Simultàniament, el vector pSuper.retro.puro (Oligoengine) va ser digerit seqüencialment amb els enzims de restricció BglIII i HindIII a 37°C durant 1 h. El producte de la digestió es va resoldre per electroforesi en un gel d'agarosa 0.8%, i la banda corresponent al plàsmid digerit va ser purificada utilitzant la columna de purificació QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). L'oligonucleòtid de doble cadena (25 ng) es va lligar amb el plàsmid pSuper digerit (120 ng) utilitzant el DNA Ligation Kit (Takara).

El producte de lligació es va transformar per xoc tèrmic en bacteris competents DH5 α (Mètodes – apartat 3.1) i es van seleccionar amb ampicil·lina en plaques d'agar. Es van seleccionar tres colònies positives i es van fer créixer en medi LB a 37°C en agitació orbital durant tota una nit. Els plàsmids es van purificar amb una miniprep (veure apartat 3.1), i 5 μ g de DNA purificat es van digerir seqüencialment amb 10 unitats dels enzims EcoRI i ClaI (New England Biolabs), durant 1 h i 30 min per a cada enzim. Un dels productes de la digestió corresponia al fragment H1-shRNA o H1-scramble, els qual consisteix en la seqüència del promotor H1 més l'oligonucleòtid per shRNA o scramble. De la mateixa manera, es va digerir el plàsmid lentiviral pLVTHM (1.5 μ g) (Didier Trono). Tant el producte de la digestió H1-shRNA o H1-scramble i el plàsmid pLVTHM digerit, van ser resolts en gels d'agarosa 2.5% i es van purificar les bandes corresponents com anteriorment s'ha descrit. Ambdós productes de purificació, H1-shRNA i H1-scramble (25 ng), van ser lligats al plàsmid digerit pLVTHM (120 ng), i posteriorment transformats en bacteris DH5 α . Es van seleccionar tres colònies crescudes en plaques d'agar amb ampicil·lina i es van fer créixer tota la nit en medi LB. El plàsmid purificat es va digerir amb EcoRI i ClaI per detectar les colònies positives per l'insert H1-shRNA o H1-scramble.

Tampó d'*annealing*: 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl

L'expressió dels constructes de shRNA d'EphA3 es va dur a terme utilitzant vectors lentivirals. Per tal de generar les partícules infectives, per cada lentivirus, es van sembrar 3 plaques de 100 mm amb cèl·lules HEK293T, que es van transfectar amb complexos de DNA-fosfat de calci (Ca₃(PO₄)₂). En el cas del DNA, per cada placa, es van incubar simultàniament els vectors pLVTHM-shRNA (20 μ g), psPAX2 (gens d'empaquetament; 15 μ g) i pM2D.G (gens d'embolcall; 6 μ g) amb una solució de CaCl₂ (2 M) i aigua destil·lada. A continuació, la solució de DNA plasmídica va ser mesclada amb un volum igual de tampó HBS (2x), afegint 1/8 de solució DNA sobre el tampó HBS i vortejant el tub 2-3 s a 600 rpm cada cop fins completar el volum final. Es van deixar formar els complexos durant 25 min a temperatura ambient, i un cop passat aquest temps, es van afegir sobre el medi de cultiu de les cèl·lules i es va deixar precipitar durant 4 hores. Passat aquest temps de transfecció, el medi de transfecció va ser retirat i es va substituir per 10 ml de medi de cultiu fresc. Es va deixar que les cèl·lules generessin les partícules lentivirals durant 48 h, després es va recollir el medi de cultiu i es va centrifugar (100.000 x g,

4°C, 2 h). El sobrenedant es va descartar, i el precipitat es va resuspendre en 75 µl de tampó TNE deixant-lo en agitació orbital durant tota la nit a 4°C.



Figure M3 – Mapes dels vectors utilitzats per al clonatge dels shRNA EphA3 i partícules lentivirals.

Les partícules lentivirals van ser titulades utilitzant citometria de flux. Es van cultivar cèl·lules HEK293T en plaques de 24 pous (30.000 cèl·lules/pou) durant 24 h. El medi de cultiu es va reduir de 0.5 ml a 0.25 ml i les cèl·lules es van infectar amb un rang de dil·lucions de les partícules lentivirals (2 µl, 1 µl, 0.5 µl, 0.25 µl, 0.125 µl, 0.062 µl i 0.031 µl). Després de 16 h es va afegir 1 ml de medi de cultiu en cada pou i es va deixar que les cèl·lules expressessin durant 48 h els plàsmids lentivirals, els quals contenien un segon cassette d'expressió per a GFP. Després del temps d'expressió les cèl·lules es van tripsinitzar, recollir en tubs, rentar dues vegades amb PBS, i finalment es va mesurar la fluorescència de la proteïna GFP en un citòmetre de flux (Cytomics FC 500, Beckman Coulter) de 10.000 cèl·lules, per determinar el nombre de cèl·lules positives per la infecció lentiviral. Les diferents dil·lucions van permetre realitzar una recta patró per tal de definir el títol de cada lentivirus.

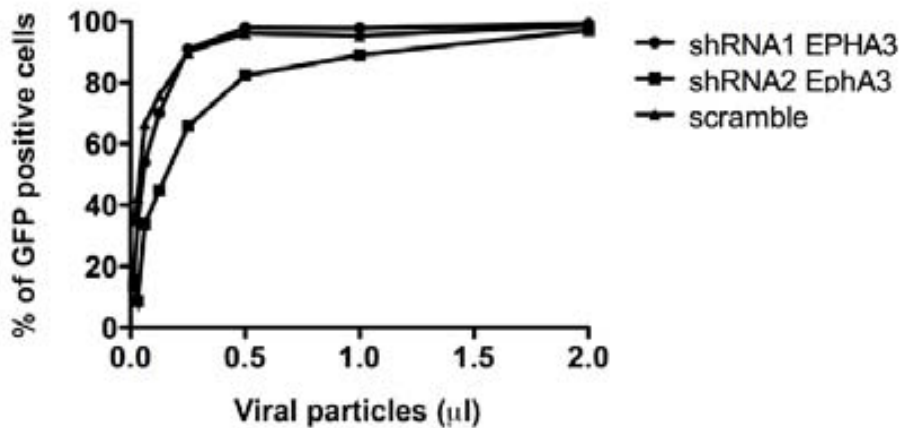


Figure M4 – Corba de titulació de les partícules lentivirals de shRNA1 EphA3, shRNA2 EphA3 i scramble.

Tampó HBS (2x): 237 mM NaCl, 42 mM HEPES, 10.2 mM KCl, 1.4 mM NaHPO₄, 10 mM D-glucosa, pH 7.05-7.12

Tampó TNE (estèril): 50 mM TrisHCl pH7.5, 130 mM NaCl, 1 mM EDTA

3.4 Clonatge

3.4.1 Plàsmids PS1

Per alguns dels experiments de reversió del creixement axonal es van utilitzar constructes de PS1 humana o PS1 amb les següents mutacions lligades a Alzheimer familiar: C410Y, M146L i Δ9. Les mutacions C410Y i M146L són mutacions puntuals de canvis d'un aminoàcid, mentre que la mutació Δ9 consisteix en la delecció de l'exó 9 del gen PSEN1. Les mutacions humanes van ser obtingudes per substitució sobre un vector base de PS1 on el domini *loop* havia estat deleccionat. Tan el cDNA de la PS1 humana com els diferents constructes de PS1 estaven clonats en un vector d'expressió pcDNA3.1 entre les dianes de restricció BamHI i XbaI (Saura, 2000).

3.4.2 Plàsmids d'EphA3. Introducció de la seqüència HA en constructes d'EphA3

El seqüència codificant l'EphA3 humana (constructes cedits per M. Lackmann) estava clonada en un vector pEFBOS per les dianes de restricció BstXI i NotI. De la mateixa manera, les seqüències codificants per EphA3 amb el domini d'unió a lligand deleccionat (ΔLBD; comprèn aminoàcids 29-207) i EphA3 amb el motiu d'unió a seqüències PDZ deleccionat (ΔPDZ; comprèn aminoàcids 981-983), també estaven clonades per les mateixes dianes de restricció en el vector pEFBOS. Per últim, les seqüències d'EphA3 i EphA3 ΔLBD en el vector pEFBOS també van ser fusionades a la seqüència codificant per GFP en el domini C-terminal entre les dianes XmaI i BamHI.

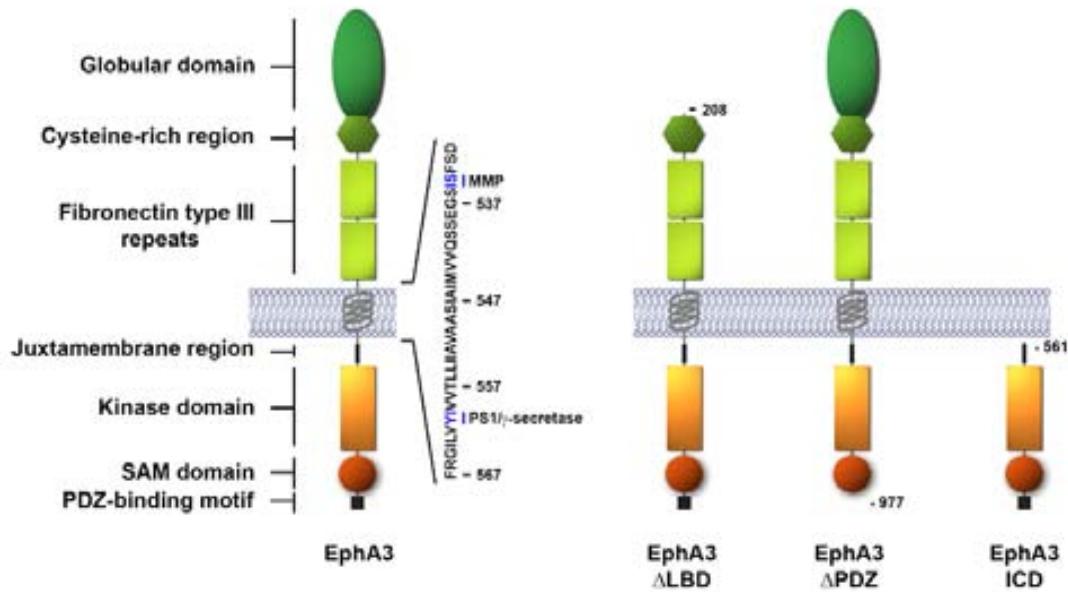


Figure M5 – Descripció gràfica dels dominis funcionals d'EphA3 i els mutants Δ LBD i Δ PDZ. Descripció gràfica del fragment corresponent a EphA3 ICD i l'hipotètic aminoàcid de tall per PS1/ γ -secretasa.

Per tal de poder detectar els vectors d'EphA3 i diferenciar-los del receptor EphA3 endògen vam afegir el *tag* hemaglutinina (HA; seqüència: ATG GGA TCC TAC CCT TAC GAC GTT CCT GAT TAC GCT AGC CTC GAA TTC) en posició C-terminal en els plàsmids d'expressió. En aquest cas l'estratègia escollida va ser substituir la proteïna de fusió GFP per una seqüència de DNA codificant per HA que contenia dues repeticions d'aquesta.

El procediment va consistir en hibridar dos oligonucleòtids de cadena simple que contenien la seqüència duplicada d'HA i que contenia dues dianes per enzims de restricció flanquejants, XmaI i BamHI. De la mateixa manera, els plàsmids EphA3 GFP i EphA3 Δ LBD GFP van ser digerits amb els mateixos enzims de manera seqüencial 1h 30 min cadascun a 37°C. El plàsmids digerits es van separar per electroforesi en gel d'agarosa i es van purificar amb QIAquick Gel Extraction Kit. Un cop purificats, els plàsmids es van lligar amb els oligonucleòtids i a continuació van ser transformats en bacteris competents DH5 α . El dia següent es van seleccionar colònies de les plaques d'agar, es van créixer en medi LB i els plàsmids es van purificar per miniprep. Els plàsmids obtinguts es van comprovar per restricció en les dianes d'inserció i es van resoldre en un gel d'agarosa per comprovar que el plàsmid era positiu per l'oligonucleòtid codificant per HA.

Constructe	Orígen	Vector	Resistència	Orígen
PS1	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	Dr. C. Saura
PS1 C410Y	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	Dr. C. Saura

PS1 M146L	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	Dr. C. Saura
PS1 Δ9	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	Dr. C. Saura
EphA3 wild type	h	pEFBOS	Ampicil·lina	Dr. M. Lackmann
EphA3 GFP	h	pEFBOS	Ampicil·lina	Dr. M. Lackmann
EphA3 HA	h	pEFBOS	Ampicil·lina	S. Marco
EphA3 ΔPDZ	h	pEFBOS	Ampicil·lina	Dr. M. Lackmann
EphA3 ΔLBD GFP	h	pEFBOS	Ampicil·lina	Dr. M. Lackmann
EphA3 ΔLBD HA	h	pEFBOS	Ampicil·lina	S. Marco
EphA3 ICD HA	h	pCMV	Ampicil·lina	S. Marco
EphA3 ICD Flag	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	S. Marco
pCMV-HA	-	-	Ampicil·lina	Clontech
pcDNA3.1 3xFlag	-	-	Ampicil·lina	Dr. V. Yuste
pSuper.Retro.Puro	-	-	Ampicil·lina	Oligoengine
pLVTHM	-	-	Ampicil·lina	Dr. Didier Trono
EGFP C1	-	-	Kanamicina	Clontech
RhoA DN	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	Dr. X. Bustelo
Rac1 wild type	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	Dra. M. Duñach
Rac1 DN	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	Dra. E. Galea
Rac1 CA	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	Dra. M. Duñach
Cdc42 DN	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	Dra. E. Galea
Cdc42 CA GFP	h	pcDNA3.1	Ampicil·lina	Dra. M. Duñach

Taula M8 – Llista de plàsmids utilitzats

3.4.3 Clonatge del domini intracel·lular d'EphA3

La seqüència del domini intracel·lular d'EphA3 (EphA3 ICD) es va obtenir per predicció utilitzant el programari ClustalW2 (European Bioinformatics Institute – EMBL). Es va realitzar un alineament del receptor EphA3 amb diversos receptors Eph i substrats coneguts pel complex PS1/γ-secretasa (Figura M5).

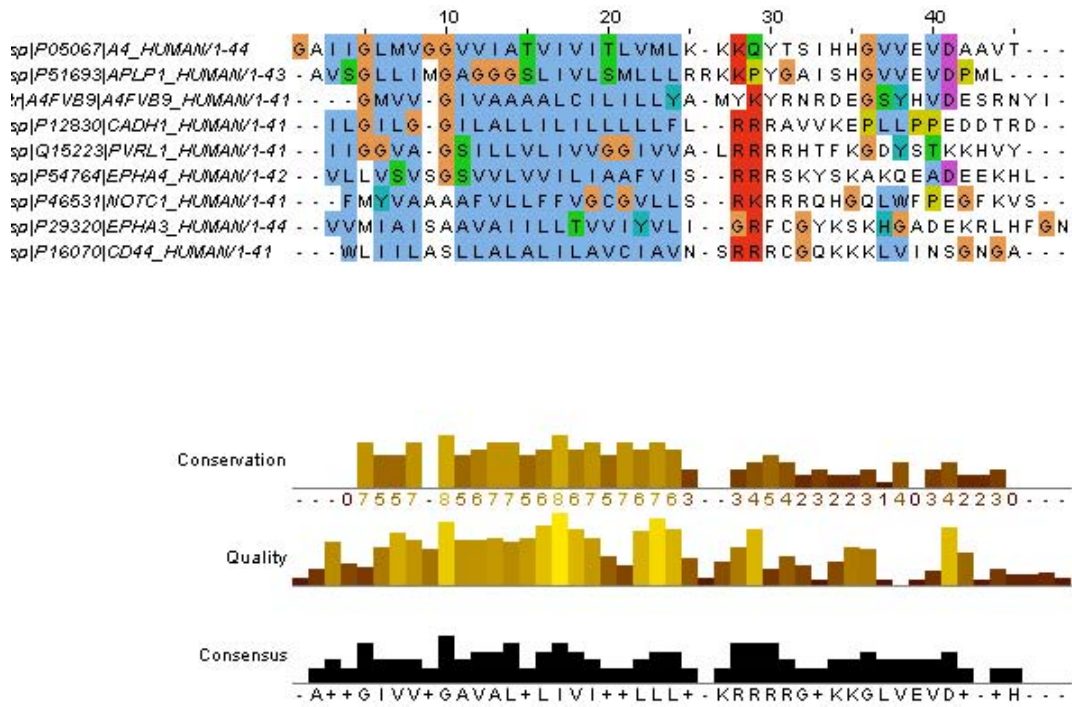


Figure M6 – Alineament de seqüències d'EphA3 amb diversos substrats de PS1/ γ -secretasa. La regió transmembrana on es situen les diverses dianes de tall apareixen amb un alt grau de conservació. Els substrats utilitzats van ser EphA4 humà, APLP1 humà, A4FVB9 humà, CADH1 humà, PVRL1 humà, NOTC1 humà i CD44 humà.

Entre els receptors d'Eph utilitzats en l'alineament es va buscar especialment les similituds amb el receptor EphB2, el qual, en treballs anteriors s'havia descrit que era un substrat de PS1/ γ -secretasa, i el seu lloc de tall havia estat definit (Litterst et al. 2007).

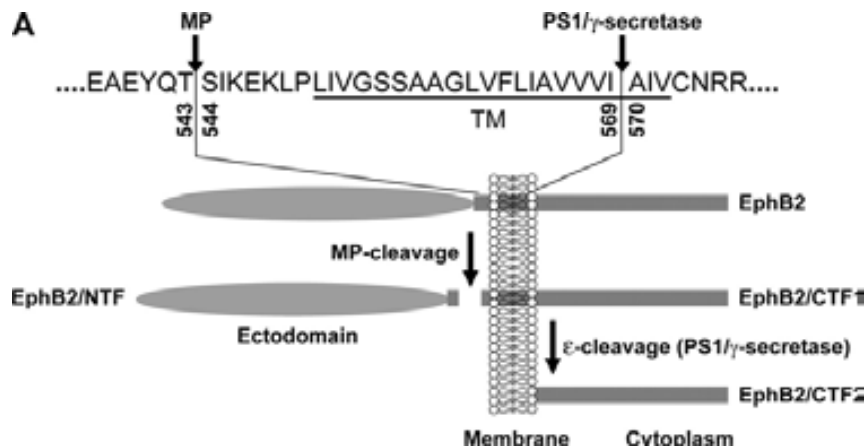


Figura M7 - Esquema dels talls per metalloproteases i el complex PS1/ γ -secretasa en el receptor EphB2. Extret de Litterst et al. 2007

Proteïna	Alineació del lloc de tall
EphB2 humà	EAEYQ TS IKEKLP L I V G S S A A G L V F L I A V V V LA I V C N R R
EphA3 humà	D S F S TS -- G E S S Q V V M I A I S A A V A I I L L T V V LY V L I G R F

Taula M5 - Alineació per ClustalW2 entre els receptors EphB2 i EphA3, mostrant l'hipotètic tall pel complex PS1/ γ -secretasa.

Per al clonatge es va partir del vector d'EphA3 humà (Dr. Lackmann) per a clonar el domini intracel·lular fent servir la tècnica de la PCR. Els encebadors es va dissenyar des del lloc de tall en la regió N-terminal fins l'últim aminoàcid en la regió C-terminal, consistent en 1272 parells de base (423 aminoàcids). Es van afegir una diana de restricció en 3' (KpnI) i una altra en 5' (EcoRI) per facilitar la inserció del DNA en un vector pCMV-HA (N-terminal; Clontech PT3283-5). Posteriorment es va extreure el DNA de EphA3 ICD i es va subclonar en un plàsmid pcDNA3.1 que contenia tres repeticions de la seqüència DYKDDDDK en el domini N-terminal, utilitzant les EcoRI i Apal.

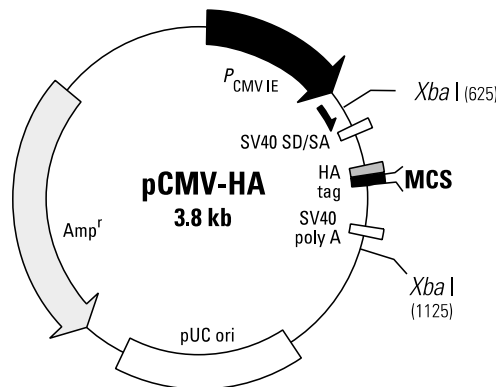


Figura M8 – Mapa del plàsmid pCMV-HA amb el *múltiple cloning site* detallat.

Encebador	Seqüència	Diana
forward	5' – CCGGAATTC <i>CCCGTATGTTTTGATTGGGAGGTTCTGTGG</i> – 3'	EcoRI
reverse	5' – CGGGGTACC <i>CCGTTACACGGGA</i> ACTGGGCCAT – 3'	KpnI

Taula M6 – Seqüències dels encebadors per a EphA3 ICD. En cursiva nucleòtids de flanqueig per a la diana de restricció, subratllat la diana de restricció i en negreta, seqüència d'unió al DNA d'EphA3 humà.

Les condicions i materials utilitzats en la PCR van ser les següents:

Polimerasa: GeneAmp® High Fidelity PCR System (Applied Biosystems)

Patró de DNA: 15 pg EphA3 cDNA humà

Encebadors: 0.1 µM

MgCl₂: 1.5 mM

dNTPs: 0.2 mM

Gen	Inicialització	Desnaturalització	Encebador	Extensió	Extensió final
EphA3 ICD	94°C, 2 min	94°C, 15 s	61°C, 30 s	72°C, 1 min	72°C, 7 min

Taula M7 – Condicions per a la PCR en el clonatge d'EphA3 ICD.

El producte de la PCR es va separar en una electroforesi en gel d'agarosa 1% i es va purificar utilitzant QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. La concentració de DNA es va determinar utilitzant un NanoDrop Photometer (Thermo Scientific). Tan el vector pCMV-HA com el producte de la PCR EphA3 ICD es van digerir seqüencialment amb els enzims de restricció EcoRI i KpnI (New England Biolabs) durant 1.5 h cadascun a 37°C. Tot seguit, el vector pCMV-HA va ser desfosforilat amb fosfatasa alcalina de vedella (CIAP; Invitrogen) durant 5 min a 50°C. Tan el vector com EphA3 ICD es van separar per electroforesi en gel d'agarosa i es van purificar utilitzant QIAquick Gel Extraction Kit. Els productes de la purificació van ser lligats durant 1h a 16°C, i transformats en bacteris competents DH5α. Les colònies obtingudes es van seleccionar i els plàsmids resultants es van purificar per miniprep, per posteriorment ser confirmades per digestió amb EcoRI i KpnI. Finalment es va comprovar el clonatge dels plàsmids d'EphA3 ICD per seqüenciació (Applied Biosystems Abi 3130xl; Servei de Genòmica - IBB/UAB).

Encebador	Seqüència
ICD1	5' – TTT GAT TGG GAG GTT CTG TG – 3'
ICD2	5' – AGA ATG GTT CCT TGG ATA GTT TCC – 3'
ICD3	5' – GAG CAG ATT GTT AGT ATT CTG G – 3'

Taula M8 – Seqüències dels encebadors utilitzats per a la seqüenciació d'EphA3 ICD.

4. MÈTODES DE BIOLOGIA CEL·LULAR

4.1. Tècniques d'immunofluorescència de cèl·lules en cultiu

Per obtenir immunomarcats per microscòpia òptica de fluorescència es van sembrar neurones hipocampals (20.000 – 30.000 cèl·lules per pou) en plaques de 24 pous que contenien cobreobjectes tractats amb poli-D-lisina. Després de 4 DIV es va retirar el medi de

cultiu a les cèl·lules, es van rentar dues vegades amb PBS i es van fixar amb paraformaldehid diluït al 4% en PBS (Electron Microscopy Sciences) durant 15 min a temperatura ambient.

A continuació, les cèl·lules es van permeabilitzar durant 7 min a temperatura ambient amb una solució amb 0.02% de saponina (Fluka) en PBS. Posteriorment es va realitzar un primer bloqueig amb una solució 0.01% de saponina i 10 mM de glicina (Sigma) en PBS durant 15 min. Finalment, es va realitzar un últim bloqueig per evitar la unió inespecífica dels anticossos amb una solució amb 5% de albúmina de sèrum boví (BSA) en PBS durant 30 min a temperatura ambient. Els anticossos primaris es van diluir en un tampó amb un 5% de sèrum normal de cabra (NGS) i es van incubar amb els cobreobjectes durant 1h i 30 min a temperatura ambient o a 4°C durant tota la nit. Després de la incubació amb anticòs primari, les cèl·lules es van rentar tres vegades en PBS durant 10 min cada rentat, en agitació i a temperatura ambient. Els anticossos secundaris es van diluir en el mateix tampó que es va utilitzar per als anticossos primaris i es va incubar durant 45 min a temperatura ambient. En alguns casos, es va incubar fal·loïdina conjugada amb Alexa 594 simultàniament amb els anticossos secundaris. De la mateixa manera, després de la incubació, les cèl·lules es van rentar tres vegades en PBS, agitació i temperatura ambient durant 10 min cada cop. Per al marcatge nuclear es va fer servir la tinció amb Hoechst 33258 dil·luït en PBS (1 µg/ml; Invitrogen), la qual es va incubar durant 20 min a temperatura ambient. Finalment, els cobreobjectes es van rentar de nou tres vegades en PBS durant 10 min en agitació i temperatura ambient. Un cop finalitzats els rentats, els cobreobjectes es van montar sobre un portaobjectes utilitzant medi de muntatge per a fluorescència FluorSave Reagent (Calbiochem). Les cèl·lules es van examinar en un microscopi de fluorescència Nikon Eclipse i90 o en un microscopi làser confocal Zeiss Axio Examiner D1 LSM 700.

4.1.1 Anàlisi de creixement axonal

Amb les imatges de neurones hipocampals obtingudes en el microscopi de fluorescència es van crear composicions amb els diferents marcatges amb anticossos utilitzant els programari ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda) i la llargada axonal va ser mesurada amb el programari Metamorph software (Molecular Devices). Els axons es van rastrejar manualment seguint principalment el marcatge per neurofilament (SMI312). Es va considerar la llargada axonal com la distància entre el final del soma i l'extrem de la neurita incloent el con de creixement. Tan el marcatge per GFP o per actina (faloïdina) van ser utilitzats com ajuda suplementària per determinar les zones més extremes de la neurita. La calibració del microscopi va permetre la conversió de píxels en µm en el programari Metamorph. Les dades finals per a la llargada axonal van ser obtingudes a partir de tres experiments independents de cultius diferents, compostos cadascun per un mínim de tres cobreobjectes (n=30 neurones/cobreobjectes) per cada condició.

4.1.2 Anàlisi de col·localització

Per a l'anàlisi de col·localització entre PS1 i el receptor EphA3, es van fixar neurones en cultiu crescudes sobre cobreobjectes (descriu en l'apartat 4.1), i es van utilitzar els anticossos contra Presenilina-1 (APS11) i el receptor EphA3 (H80), respectivament.

Les imatges van ser obtingudes en un microscopi làser confocal Zeiss Axio Examiner D1 LSM 700 en forma de seccions (7 talls/secció; 0.5 µm/tall) amb un objectiu d'immersió de 63 augments i un zoom 2x. Les imatges van ser analitzades amb el programari ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda). L'anàlisi de col·localització es va dur a terme en els dos talls centrals de cada secció, seleccionant de 3 a 5 regions d'interès (neurites i con de creixement) en cada tall. Les imatges van ser analitzades seguint una instrucció macro (Maria Calvo, Unitat de Microscopia Confocal de la UAB), la qual basava el seu funcionament en el *plugin highlighter* (P. Bourdoncle, Institute Jacques Monod, Service Imagerie, Paris, France). La instrucció macro generava una imatge binària per als píxels que col·localitzaven en els dos marcatges a partir de l'anàlisi píxel per píxel de cada canal, la qual es definia prèviament amb una selecció manual del llindar d'especificitat i una ratio de les intensitats entre ambdós canals. Els resultats es van expressar com un percentatge de píxels que col·localitzaven entre el nombre total de píxels per cada canal.

4.2 Tècniques d'immunohistoquímica amb fluorescència

4.2.1 Obtenció i fixació de les mostres biològiques

Per a l'obtenció de mostres per a immunohistoquímica els embrions de ratolí (E15.5) van ser extrets del sac embrionari i separats de la placenta. Els embrions sencers van ser fixats amb paraformaldehid 4% per perfusió cardíaca. Un cop fixats els embrions, es van deixar durant tota la nit en una solució de paraformaldehid 4% fresc a 4°C, i el dia següent es van dissecar els cervells i de nou es van deixar incubant en una solució de paraformaldehid 4% a 4°C durant 24 h. La solució de paraformaldehid es va substituir per una solució d'etanol 70% a 4°C, fins a ser englobades en blocs de parafina per a l'obtenció de talls histològics utilitzats en immunohistoquímica.

4.2.2 Immunohistoquímica amb fluorescència

Es van obtenir seccions de cervell coronals (5 µm) dels blocs de parafina utilitzant un micròtom (Leica). Les seccions van ser desparafinades amb dos banys de xilol (Merk) i rehidratades utilitzant una bateria de solucions d'etanol de concentracions decreixents amb incubacions seqüencials de 3 min (100%, 100%, 96%, 70% i 50%). Per tal d'exposar l'antigen, les seccions es van incubar en una solució de citrat sòdic (Sigma) en ebullició durant 8 min en el microones amb una potència de 200 W constants. A continuació es van realitzar tres rentats de 5 min amb TBS a temperatura ambient i en agitació orbital. Finalment les mostres es van bloquejar en tampó de bloqueig durant 30 min a temperatura ambient.

La immunodetecció es va dur a terme incubant les mostres amb anticòs primari dil·luït en solució de bloqueig, durant 2 h a temperatura ambient o tota la nit a 4°C. El dia següent es van rentar les seccions en TBS i es van incubar amb l'anticòs secundari conjugat a un fluoròfor (Alexa 488, Alexa 555 o Alexa 594) durant 2 h a temperatura ambient. Posteriorment es van rentar les seccions amb TBS tres vegades durant 10 min cadascuna, i es van tenyir els nuclis amb tinció Hoechst durant 30 min a temperatura ambient. Finalment les seccions es van cobrir amb un cobreobjectes i amb medi de muntatge FluorSave Reagent. Les seccions es van examinar en un microscopi confocal Zeiss Axio Examiner D1 LSM 700.

Tampó de bloqueig: Sèrum de cabra 5% (Gibco), Tween 0.02% (Sigma), TBS.

5. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Els experiments es van realitzar com a mínim per triplicat. Els resultats de les gràfiques mostren la mitjana dels diferents experiments amb la desviació estàndard de la mitja. Els grups experimentals van ser comparats mitjançant l'anàlisi de variància amb el test ANOVA d'una via o dues vies en comparar més de dos grups entre sí, seguits d'un test *post hoc* Bonferroni. Els valors van ser considerats significatius quan $p < 0.05$. Per a realitzar els anàlisis estadístics es va utilitzar el programari GraphPad Prism 5.

RESULTATS

**CAPÍTOL I: PS1 REGULA EL
CREIXEMENT AXONAL**

CAPÍTOL I: PS1 REGULA EL CREIXEMENT AXONAL

1. Alteracions del creixement axonal en ratolins PS1^{-/-}

La PS1 és essencial durant el desenvolupament del sistema nerviós central (SNC), de manera que la seva deficiència en ratolins PS1^{-/-} causa una diferenciació prematura dels progenitors neuronals, el que provoca un augment de neurones postmitòtiques a E12.5 i una disminució de neurones en estadis posteriors (Shen et al., 1997). La deficiència de PS1 durant el desenvolupament causa dèficits en la migració neuronal i la desorganització de les capes de l'escorça cerebral, la zona intermèdia, la zona ventricular i la zona subventricular, els quals porten a una reducció de la mida del cervell i de l'escorça cerebral (Handler et al., 2000). Aquests defectes en els embrions PS1^{-/-} poden ser deguts a alteracions en el processament i la senyalització de Notch (Shen et al., 1997; Wong et al., 1997). Així, els ratolins PS1^{-/-} mostren una disminució de l'expressió de Hes5, el qual és regulat directament pel receptor Notch, el que incrementa l'expressió de Dll1, causant un augment de neurones diferenciades. Aquests defectes severos durant el desenvolupament causen la mort dels ratolins PS1^{-/-} just al nèixer.

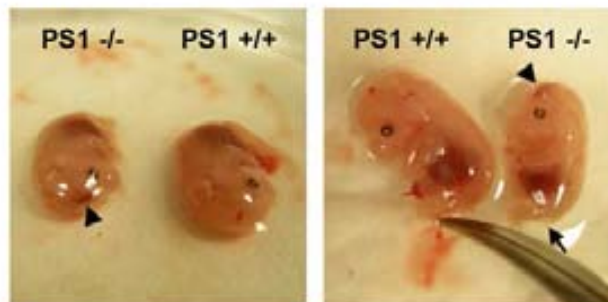


Figura 1 – Fenotip dels embrions PS1^{+/+} i PS1^{-/-} obtinguts per creuament de ratolins heterozigots PS1^{+/-}. Panell esquerre: Els embrions PS1^{-/-} presenten hemorràgies internes en l'encèfal (punta de fletxa). Panell dret: Els embrions PS1^{-/-} mostren una mida significativament més petita que els ratolins PS1^{+/+}, un dèficit en el desenvolupament de la cua (fletxa) i hemorràgies cerebrals internes (punta de fletxa). La deficiència d'expressió de PS1 és letal, i els embrions PS1^{-/-} moren de forma prematura durant l'etapa perinatal.

Per estudiar el paper de PS1 en el desenvolupament del cervell vam analitzar el fenotip de ratolins PS1^{+/+} (control) i PS1^{-/-} (PS *knockout*) a estadi embrionari E15.5. En aquest estadi es produeix un pic en la neurogènesi, i per tant permet estudiar canvis morfològics de les diferents regions del cervell. Els embrions PS1^{-/-} presenten una reducció de l'embrió, de la longitud de la cua i de l'encèfal (Figura 1). Es van realitzar l'anàlisi immunohistoquímic amb diferents marcadors cel·lulars de progenitors neuronals (nestina), neurones immadures (doblecortina), i neurones postmitòtiques (MAP2, NeuN) i morfològics d'axò (neurofilament, tau) i dendrites (MAP2). Aquests estudis es van centrar en la zona ventricular, coneguda per

Resultats: PS1 regula creixement axonal

ser una zona de proliferació cel·lular i per tant neurogènica, i en l'hipocamp. La zona ventricular, i concretament la subventricular, és una regió del cervell d'especial interès durant el desenvolupament degut a la gran presència de progenitors neuronals. Els embrions PS1^{-/-} presenten una mida anormal dels ventricles laterals, i la presència d'hemorràgies internes. L'eixamplament dels ventricles és deguda a la pèrdua de capes cel·lulars en diverses regions del cervell en els ratolins PS1^{-/-} (Handler et al., 2000).

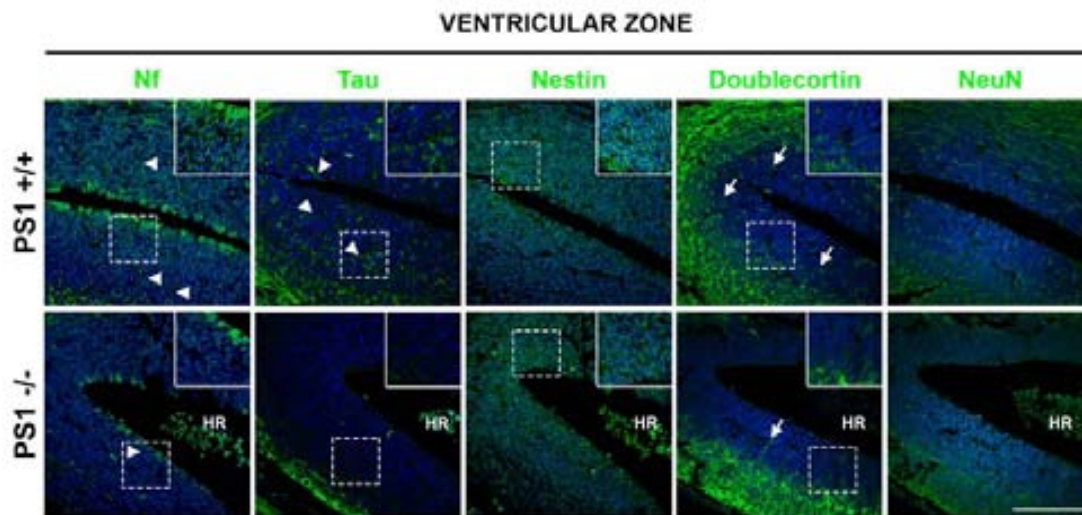


Figura 2 – Anàlisi immunohistoquímica amb marcadors neuronals de la regió ventricular d'embrions PS1^{+/+} i PS1^{-/-}. Seccions coronals corresponents a la zona ventricular d'embrions PS1^{+/+} i PS1^{-/-} (E15.5) Anàlisi immunohistoquímica per diversos marcadors neuronals (verd): neurofilament (Nf; axons), MAPT/tau-1 (Tau; axons), nestina (Nestin; progenitors neuronals), doblecortina (Doublecortin; neurones immadures), marcador nuclear de neurones (NeuN; neurones madures), i tinció nuclear amb Hoechst (blau). L'anàlisi revela una disminució significativa del nombre i longitud dels axons en embrions PS1^{-/-} en comparació als embrions PS1^{+/+} (Nf i Tau), acompanyat d'una disminució de la neurogènesi i la migració neuronal (Doublecortin).

L'expressió de nestina, un tipus de filament intermedi present només en progenitors neuronals, és similar entre els embrions PS1^{-/-} i PS1^{+/+} (Figura 2). Per contra, les neurones doblecortina positives es troben limitades a la zona intermèdia de la regió ventricular en els embrions PS1^{-/-}, mentre que els embrions PS1^{+/+} presenten neurones doblecortina positives migrant des de la zona subventricular cap a la zona intermèdia (Figura 2). Per altra banda, NeuN, un marcador de neurones postmitòtiques diferenciades, no varia significativament entre ambdós genotips (Figura 2). En resum, els ratolins PS1^{-/-} tenen un nombre inferior de neurones immadures en la regió subventricular, fet que està d'acord amb els resultats previs que indiquen una disminució de la neurogènesi i defectes en la migració neuronal (Handler et al., 2000).

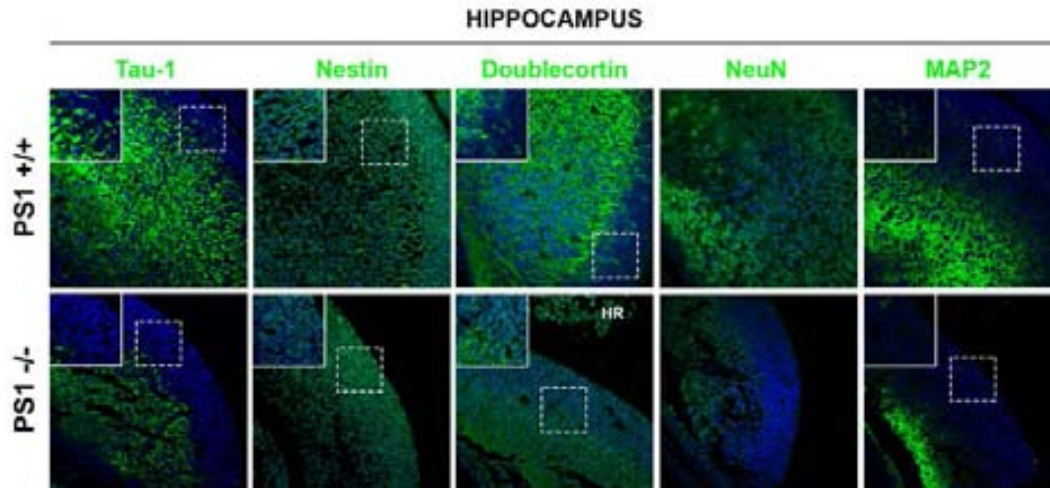


Figura 3 – Anàlisi immunohistoquímic amb marcadors neuronals de la regió hipocampal d'embrions PS1^{+/+} i PS1^{-/-}. Seccions coronals corresponents a l'hipocamp d'embrions PS1^{+/+} i PS1^{-/-} (E15.5). Anàlisi immunohistoquímic per diversos marcadors neuronals (verd): MAPT/tau-1 (Tau; axons), nestina (Nestin; progenitors neuronals), doblecortina (Doublecortin; neurones immadures), marcador nuclear de neurones (NeuN; neurones madures), MAP2 (marcador dendrític en neurones madures), i tinció nuclear amb Hoechst (blau). L'anàlisi revela una disminució significativa del nombre d'axons en embrions PS1^{-/-} en comparació a embrions PS1^{+/+} (Tau), acompanyat d'una disminució de la neurogènesi i la migració neuronal (Doublecortin), i una disminució de les neurones madures i funcionals (NeuN i MAP2).

De la mateixa manera que en la zona ventricular, l'hipocamp presenta una disminució significativa del nombre de capes cel·lulars en els embrions PS1^{-/-}. El marcatge amb nestina indica que la densitat de progenitors neuronals està reduïda en els embrions PS1^{-/-} (Figura 3). Tot i així, la longitud de les neurites positives per nestina és menor en els embrions PS1^{-/-} (Figura 3). El marcatge amb doblecortina presenta una disminució de la intensitat en els embrions PS1^{-/-} tot i que el nombre de neurones positives és similar en ambdós genotips en la regió externa de l'hipocamp. Tot i això, la capa cel·lular més pròxima als ventricles en els embrions PS1^{-/-} mostra una disminució de neurones doblecortina positives, un marcatge corresponent probablement a neurones en migració (Figura 3). El marcatge amb NeuN mostra una disminució significativa del nombre de neurones madures diferenciades en l'hipocamp dels embrions PS1^{-/-} (Figura 3). A més, el nombre de neurones MAP2 positives està reduït en els embrions PS1^{-/-}. Aquests resultats indiquen una reducció de la maduració i diferenciació neuronal en l'hipocamp en els ratolins PS1^{-/-}. Per estudiar el paper de PS1 en la morfologia neuronal, vam realitzar anàlisis immunohistoquímics amb neurofilament, un tipus de filament intermedi específic d'axons. El marcatge amb un anticòs anti-neurofilament (SMI312) mostra una reducció significativa en el nombre i la llargada dels axons en l'hipocamp d'embrions PS1^{-/-} (Figura 4, puntes de fletxa). De fet, el marcatge de neurofilament es limita al soma de les neurones en la majoria dels casos en els ratolins PS1^{-/-}.

Aquests resultats suggereixen que la PS1 pot estar regulant el creixement axonal durant el desenvolupament.

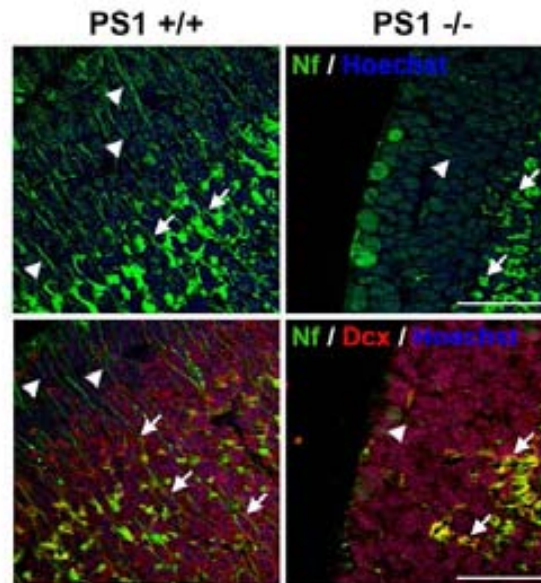


Figura 4 – Els embrions PS1^{-/-} presenten una reducció severa del marcatge axonal en l'hipocamp. Seccions coronals corresponents a l'hipocamp d'embrions PS1^{+/+} i PS1^{-/-}. Anàlisi immunohistoquímic per diversos marcadors neuronals (verd): neurofilament (Nf; axons), doblecortina (Dcx; neurones immadures), i tinció nuclear amb Hoechst (blau). L'anàlisi mostra la reducció significativa de la longitud axonal en les neurones hipocampals d'embrions PS1^{-/-} (punta de fletxa). El marcatge amb doblecortina col·localitza amb el marcadore axonal en els cossos neuronals (fletxes), però s'observa la desaparició del marcadore per neurofilament en les extensions neurítiques corresponents als axons en els ratolins PS1^{-/-}.

Els estudis d'immunofluorescència també mostren una coexpressió de doblecortina i neurofilament en neurones de les capes més internes de l'hipocamp en ratolins PS1^{+/+} (Figura 4). Per contra, la disminució del marcatge de NeuN (Figura 3) es veu acompanyada per la disminució del nombre i longitud dels axons en l'hipocamp de ratolins PS1^{-/-}. Això suggereix la disminució del nombre de neurones diferenciades i funcionals està associada a l'alteració en el correcte desenvolupament de l'axó en les neurones PS1^{-/-}. Per últim, s'observa la disminució de neurofilament i del nombre de projeccions des dels cossos neuronals en els ratolins PS1^{-/-} (Figura 2). Per corroborar els resultats obtinguts amb neurofilament, també vam realitzar un anàlisi immunohistoquímic amb anticòs anti-tau-1, una proteïna associada a microtúbuls, la qual es troba enriquida principalment en axons. El marcatge tau-1 està disminuït de forma significativa en els embrions PS1^{-/-} (Figura 3), fet que confirma els resultats amb neurofilament. Resultats similars amb tau-1 es poden observar en la zona ventricular, el qual és gairebé absent en la zona més pròxima al ventricle i no presenta marcatge fins arribar al llindar entre la zona intermèdia i l'escorça (Figura 2).

En conjunt, aquests resultats suggereixen que l'absència de PS1 causa una alteració severa en el desenvolupament de l'hipocamp i la zona ventricular, la qual està caracteritzada per la pèrdua de capes cel·lulars, la disminució en el nombre de neurones immadures en migració, i de neurones madures. De forma rellevant, el nombre i longitud dels axons estan disminuïts en hipocamp i en la zona ventricular en absència de PS1, és deguda segurament a l'alteració de la maduració neuronal.

2. Alteració del creixement axonal en neurones hipocampals PS1^{-/-}

Per analitzar els mecanismes moleculars regulats per la PS1 durant el creixement axonal vam estudiar neurones hipocampals en cultiu obtingudes d'embrions PS1^{+/+} / PS1^{+/-} i PS1^{-/-} (E15.5) provinents de creuaments de ratolins heterozigots PS1^{+/-} (Shen et al., 1997) (Figura 1). Les neurones hipocampals es van cultivar a baixa densitat ($1.6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²) en plaques de 24 pous durant 4DIV. Aquest temps de cultiu és suficient perquè les neurones es polaritzin i iniciïn la fase de creixement axonal, una etapa prèvia a la maduració dendrítica i l'establiment de sinapsis (Govek et al., 2005) i (Da Silva and Dotti, 2002). Les neurones es van marcar amb anticossos anti-neurofilament (SMI312) per detectar els axons, i actina (faloïdina-Alexa594) per fer un seguiment de les neurites i els cons de creixement. Les imatges van ser captades utilitzant microscopia de fluorescència i aquestes van ser processades utilitzant el programari Metamorph per tal de mesurar la longitud de l'axó. Els resultats obtinguts demostren una disminució significativa (50%) de la llargada de l'axó en neurones hipocampals PS1^{-/-} (Figura 5; n=90 cèl·lules/experiment, n=3 experiments). Aquest resultat confirma que la PS1 regula el creixement axonal en neurones hipocampals *in vitro* durant el desenvolupament.

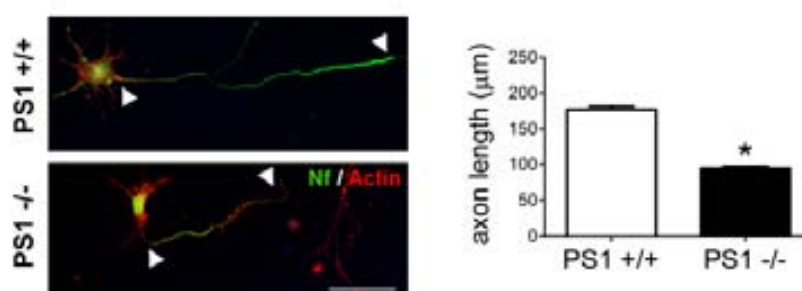


Figura 5 - La deficiència en PS1 induïx la reducció del creixement axonal en neurones hipocampals. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} i PS1^{-/-} a 4DIV. L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per neurofilament (Nf; verd) i actina (Actin; vermell), revela una disminució significativa (aproximadament 50%) de la longitud axonal en les neurones PS1^{-/-}. Aquesta reducció del creixement axonal suggereix la implicació de PS1 en la regulació del creixement axonal.

3. PS1 regula el creixement axonal a través de l'activitat γ -secretasa

PS1 és el component catalíticament actiu del complex γ -secretasa, una aspartil proteasa encarregada de la proteòlisi de proteïnes transmembrana de tipus I (Lleo and A Saura, 2011). La regulació de les vies de senyalització de PS poden ser dependents o independents de la seva activitat catalítica, com és el cas de la regulació de la via Wnt/ β -catenina (Soriano et al., 2001; Koo and Kopan, 2004). Per tal de discernir si l'activitat γ -secretasa estava implicada en l'efecte de PS sobre el creixement axonal vam realitzar experiments farmacològics amb un inhibidor reversible de l'activitat γ -secretasa (DAPT; (Dovey et al., 2001; Morohashi et al., 2006)). Les neurones hipocampals es van cultivar en presència o absència de DAPT o vehicle (DMSO) en el medi de cultiu durant 0-4DIV. Posteriorment les neurones es van fixar i marcar amb SMI312 com s'ha descrit prèviament. Les imatges de fluorescència i la quantificació mostren una longitud axonal significativament menor en les neurones tractades amb DAPT comparades amb les neurones tractades amb vehicle (Figura 6). Aquest resultat és similar a l'efecte en el creixement axonal en neurones PS1^{-/-}, el que suggereix que el creixement de l'axó depèn de l'activitat γ -secretasa.

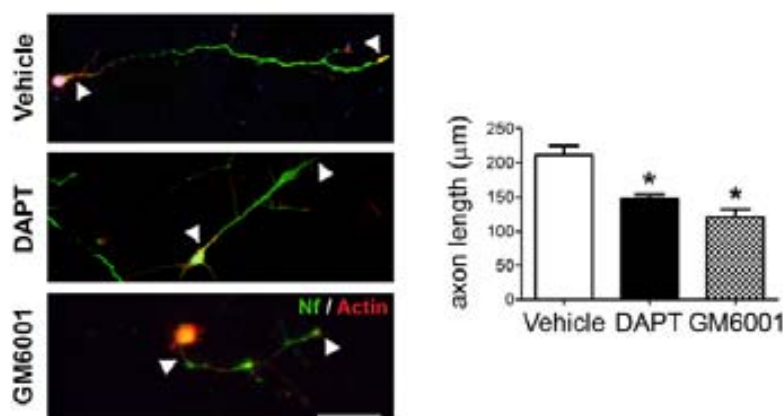


Figura 6 - La inhibició de l'activitat PS/ γ -secretasa induïx la reducció del creixement axonal en neurones hipocampals. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} a 4DIV. Les neurones van ser tractades de 0-4DIV amb vehicle (DMSO), inhibidor de γ -secretasa (DAPT) o inhibidor d'ampli espectre per metaloproteases (GM6001). L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per neurofilament (Nf; verd) i actina (Actin; vermell), revela una disminució significativa de la longitud axonal en les neurones tractades amb DAPT o GM6001 en comparació a les neurones control, tractades amb vehicle. Aquesta reducció de la longitud axonal suggereix que l'activitat γ -secretasa de PS1 és responsable de la regulació del creixement axonal.

L'activitat de PS/ γ -secretasa requereix que prèviament el substrat sigui tallat per una metaloproteasa, normalment anomenada α -secretasa. Diverses metaloproteases de matriu extracel·lular (MMP), incloent la família de les desintegrines i metaloproteases ADAM, com són ADAM-9, ADAM-10 i ADAM-17 tenen activitat α -secretasa, i per tant poden exercir el tall

previ al complex γ -secretasa (Beel and Sanders, 2008). L'inhibidor d'ampli espectre de MMPs (GM6001) durant 4DIV va disminuir el creixement axonal (50%) en neurones hipocampals, un efecte similar a l'observat en les neurones tractades amb DAPT (Figura 6). Aquest resultat és consistent amb la idea què les activitats catalítiques α - i γ -secretasa regulen el creixement axonal i per tant, un substrat comú d'ambdues proteases podria estar mediant aquest efecte.

Per tal d'estudiar si la PS1/ γ -secretasa tenia un efecte similar en dendrites es van fer tincions amb el marcador dendrític MAP2, en neurones hipocampals tractades durant 3, 4 i 7DIV amb vehicle o DAPT. Aquests resultats, obtinguts per la Dra. L. Labrada en el nostre laboratori, no mostren diferències en quant al nombre de dendrites primàries al llarg dels diversos temps de creixement en les neurones tractades amb DAPT. Per contra, la llargada dels processos dendrítics és major en les neurones tractades amb DAPT en comparació a les control (Figura 7). Aquest resultat suggereix que, al contrari que en els axons, la PS1/ γ -secretasa inhibeix el creixement de les dendrites.

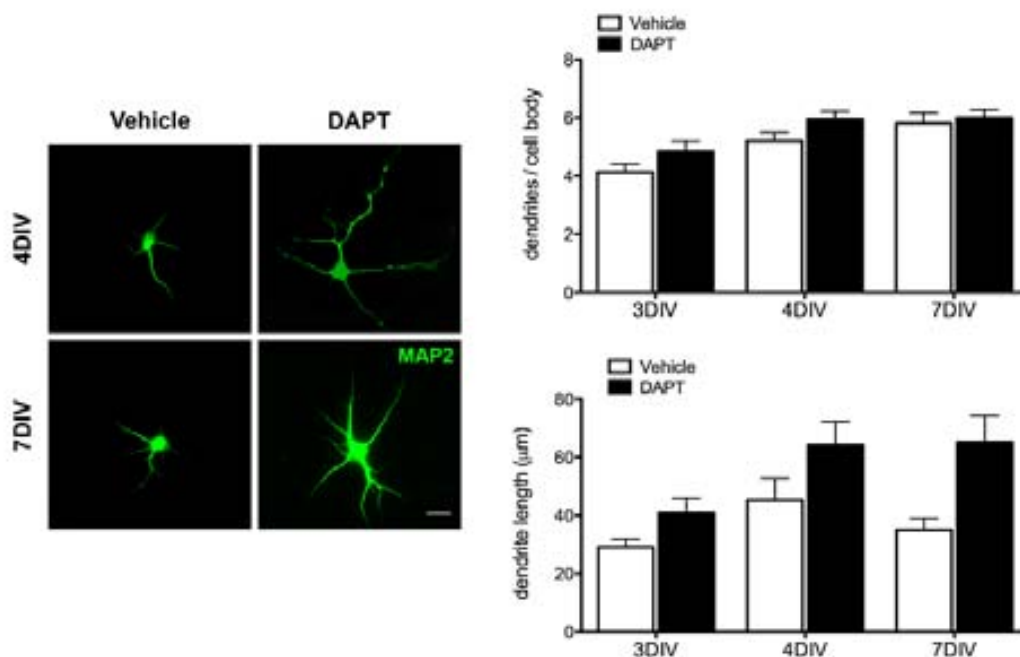


Figura 7 - La inhibició de l'activitat PS/ γ -secretasa induïx l'augment del creixement dendrític en neurones hipocampals. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} a 4DIV. Les neurones van ser tractades de 0-4DIV amb vehicle (DMSO), inhibidor de γ -secretasa (DAPT). L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per MAP2 (MAP2; verd) revela un augment significatiu de la longitud dendrítica en les neurones tractades amb DAPT en comparació a les neurones control, tractades amb vehicle. Aquest augment de la longitud dendrítica suggereix que l'activitat γ -secretasa de PS1 és responsable de la regulació positiva del creixement dendrític, un efecte oposat al que succeeix en el creixement axonal.

4. Efecte de les mutacions en PS1 associades a Alzheimer familiar en el creixement axonal

Les mutacions de PS1 associades a l'Alzheimer familiar hereditari alteren l'estructura molecular del complex γ -secretasa i l'activitat catalítica de l'enzim. S'ha demostrat que una gran part d'aquestes mutacions disminueixen l'activitat proteolítica de PS1, la qual pot ser deguda tan a una alteració de l'eficiència catalítica com per un canvi de reconeixement espacial del substrat (Bentahir et al., 2006). En realitat, part d'aquestes mutacions actuen com a pèrdua de funció durant el processament del substrat en el lloc de tall ϵ (Shen and Kelleher, 2007).

Per tal d'estudiar l'efecte de les mutacions en PS1 associades a Alzheimer familiar en el creixement axonal, es van cultivar neurones hipocampals PS1^{+/+} i PS1^{-/-} durant 2DIV, moment en què es van transfectar amb plàsmids que contenien els gens de PS1 humana *wild-type* o amb les mutacions C410Y, M146L i $\Delta 9$, prèviament descrites en el nostre laboratori (Saura, 2000). Els resultats obtinguts van confirmar que les neurones PS1^{-/-} presenten una reducció significativa de la llargada de l'axó, la qual és revertida a l'expressar el gen de la PS1 humana (Figura 8). L'expressió de PS1 amb les mutacions puntuals M146L i C410Y augmentaven significativament el creixement axonal en neurones PS1^{-/-}. En canvi, l'expressió de la forma mutada PS1 $\Delta 9$, una mutació que causa la deleció de l'exó 9 on es troba el lloc proteolític de PS1 i que aboleix l'activitat γ -secretasa, disminueix significativament el creixement axonal en neurones PS1^{+/+}. De la mateixa manera, l'expressió de PS1 $\Delta 9$ en neurones PS1^{-/-} no és capaç de revertir l'efecte en el creixement axonal degut a la pèrdua de funció de PS1 (Figura 8). Aquest resultat indica que l'activitat PS1/ γ -secretasa és necessària per a un correcte creixement axonal.

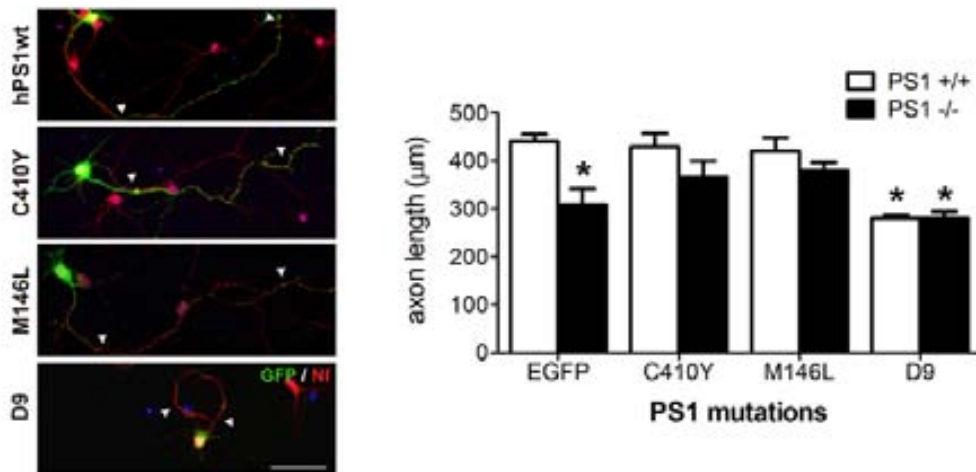


Figura 8 - L'abolició de l'activitat PS/ γ -secretasa induïda per mutacions d'Alzheimer familiar indueix la reducció del creixement axonal. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} i PS1^{-/-}, a 4DIV. Les neurones van ser co-transfectades transitòriament a 2DIV amb un vector d'EGFP i constructes de PS1 *wild-type*, o constructes que contienien les mutacions lligades a Alzheimer familiar C410Y, M146L o Δ 9. L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per EGFP (verd) i neurofilament (Nf; vermell), va mostrar que l'expressió de constructes amb una certa activitat γ -secretasa (M146L i C410Y) eren capaços de revertir el creixement axonal en neurones PS1^{-/-}. Per contra l'expressió de constructes de PS1 amb la mutació Δ 9 no va ser suficient per recuperar el creixement axonal en neurones PS1^{-/-}, i va actuar com a dominant negatiu per a l'activitat γ -secretasa en neurones PS1^{+/+} induint-hi una reducció de la longitud axonal.

5. PS1 regula la formació de sinapsis a través de l'activitat γ -secretasa

Durant la diferenciació i maduració neuronal, és necessari un correcte creixement axonal per a que les neurones projectin els axons per formar sinapsis funcionals. Com els resultats anteriors van demostrar que l'activitat γ -secretasa és necessària per al creixement dels axons, vam hipotetitzar que l'activitat γ -secretasa podia estar implicada en la formació de sinapsis.

Per tal d'estudiar la implicació de l'activitat PS1/ γ -secretasa en la formació de sinapsis, vam cultivar neurones hipocampals durant 16DIV. Les neurones van ser tractades amb vehicle o DAPT, els quals eren renovats cada 48 h. Per determinar el nombre de sinapsis es va utilitzar un marcador presinàptic (sinaptofisina) i un marcador postsinàptic (PSD-95), la localització dels quals va ser analitzada utilitzant microscopia confocal. Es va considerar les sinapsis funcionals quan una àrea amb marcatge per sinaptofisina es superposava en algun punt amb una àrea amb marcatge per PSD-95. L'anàlisi de les imatges mitjançant el programari ImageJ, mostra que en les neurones tractades amb DAPT no es produeix un canvi significatiu en comparació amb les neurones control en el grau de col·localització (PSD-95/sinaptofisina) d'ambdós marcadors (Figura 9). Aquest resultat suggereix que ambdós marcadors són vàlids com a marcadors sinàptics. Per contra, les diferències en el

gra de col·localització sinaptofisina/PSD-95 són atribuïbles al fet que la sinaptofisina localitza habitualment en vesícules sinàptiques, les quals degut al seu transport poden trobar-se en altres regions. De manera rellevant, el tractament amb DAPT produeix una reducció significativa (50%) en el nombre de sinapsis respecte les neurones control (Figura 9). En conjunt, aquests resultats demostren que la PS1/ γ -secretasa regula el creixement axonal i la formació/establiment de les sinapsis durant la maduració neuronal.

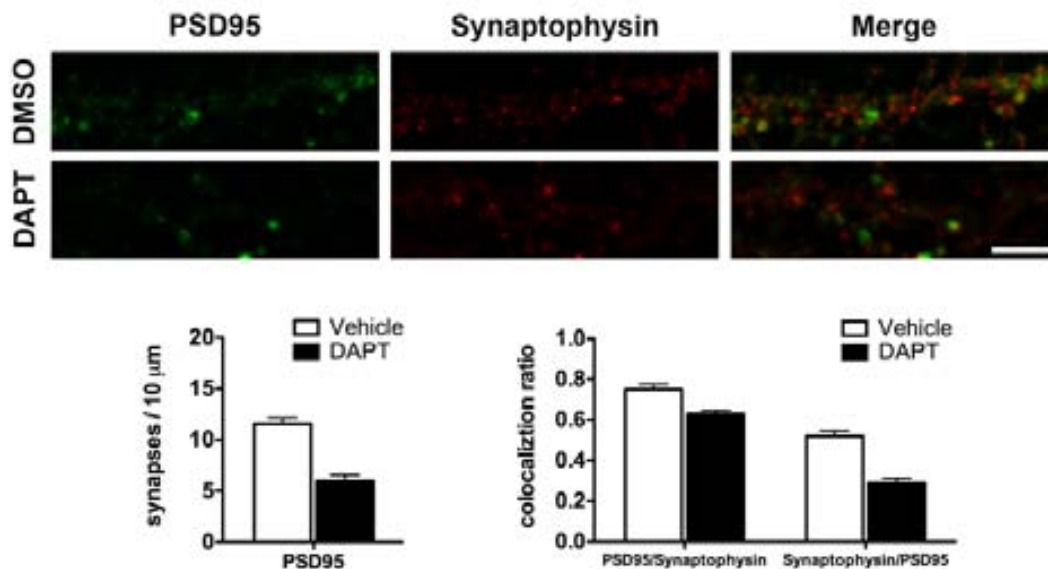


Figura 9 - La inhibició de l'activitat PS/ γ -secretasa redueix la formació de sinapsis en neurones hipocampals. Anàlisi de col·localització (a) entre el marcador postsinàptic PSD-95 (PSD95; verd) i el marcador presinàptic sinaptofisina (Synaptophysin; vermell) en neurones hipocampals PS1^{+/+} a 16DIV. Les neurones van ser tractades amb DAPT (0-16DIV) o vehicle (DMSO). Es consideren sinapsis funcionals aquelles regions on el marcatge de sinaptofisina es troba solapat en algun punt amb el marcatge per PSD-95. (b) Les neurones tractades amb DAPT presenten una reducció significativa del nombre de sinapsis respecte les neurones tractades amb vehicle. Aquest resultat suggereix que l'activitat PS/ γ -secretasa regula l'establiment de sinapsis en neurones hipocampals. (c) L'anàlisi de col·localització revela que el 75% de regions PSD-95 positives es troben solapades amb sinaptofisina en les neurones tractades amb vehicle, i el 64% en les neurones tractades amb DAPT. Per contra, el 52% de les regions sinaptofisina positives es troben solapades amb PSD-95 en les neurones tractades en vehicle, i el 29% en neurones tractades amb DAPT.

**CAPÍTOL II: PS1 REGULA EL CREIXEMENT
AXONAL A TRAVÉS DEL
RECEPTOR EPHA3**

CAPÍTOL II: PS1 REGULA EL CREIXEMENT AXONAL A TRAVÉS DEL RECEPTOR EPHA3

La família dels receptors (Eph) i lligands d'efrina regulen el creixement axonal durant la morfogènesi neuronal a través d'interaccions entre neurones oposades (Murai and Pasquale, 2005). Així,

la unió del lligand de la neurona postsinàptica al receptor EphA3 presinàptic indueix l'activació per autofosforilació d'aquest i la transducció de la senyal intracel·lular. L'activació del receptor EphA3 inhibeix l'elongació i la direccionalitat dels axons (Marquardt et al., 2005; Nishikimi et al., 2011), mentre que la unió del lligand ephrinA5 inhibeix el creixement axonal en neurones sensorials, corticals i hipocampals (Gao et al., 1999) (Himanen et al., 2010). Actualment es desconeix si els receptors d'efrina regulen el creixement i/o la repulsió axonal a través d'altres mecanismes independents de lligand. Alguns estudis però, han mostrat que el receptor EphB2, o els lligands ephrinB1 i ephrinB2 són substrats del complex γ -secretasa (Arvanitis and Davy, 2008), malgrat que la funció dels productes resultants d'aquesta proteòlisi és desconeguda. De manera interessant, EphA3 interacciona amb ADAM10, una metaloproteasa de membrana (Janes et al., 2005). En aquest treball vam estudiar la possibilitat que la PS1/ γ -secretasa regulés el creixement axonal a través del receptor EphA3, el qual s'expressa durant el desenvolupament de l'hipocamp (Yue et al., 2002; Kudo et al., 2005).

1. PS1 i EphA3 col·localitzen i interaccionen en els axons de neurones en cultiu

Per tal d'estudiar la localització de PS1 i EphA3 en l'hipocamp es va realitzar un estudi de col·localització en neurones hipocampals en cultiu. Les neurones es van sembrar a baixa densitat, es van créixer durant 4DIV abans de realitzar marcatges amb anticossos contra PS1 (APS11) i EphA3 (H80) a diferents dilucions (1:50, 1:100, 1:200 i 1:500). A més, es van realitzar controls negatius només amb anticossos secundaris per descartar la possibilitat de superposició de canals. Tan PS1 com EphA3 s'expressen en neurones hipocampals en cultius a 4DIV (Figura 10a). L'anàlisi de col·localització en les imatges obtingudes mitjançant el programari ImageJ, va mostrar que PS1 i EphA3 col·localitzen de manera significativa al llarg de l'axó i en menor mesura en regions concretes del con de creixement (Figura 10a). A 2DIV el 49.55% d'EphA3 col·localitza amb PS1 en l'axó, mentre que només el 34.60% de PS1 col·localitza amb EphA3 (Figura 10b). Als 4DIV, el 51.14% d'EphA3 col·localitza amb PS1 mentre que el 35.55% de PS1 col·localitza amb EphA3 (Figura R8-b). L'alt grau de col·localització de PS1 i EphA3 al llarg de l'axó suggereix que PS1 pot estar mediant la senyalització per creixement axonal a través d'EphA3. El fet que en el con de creixement la col·localització de PS1 i EphA3 sigui més discreta, sembla lògica degut a que el dinamisme en el con de creixement és molt alt i per tant els constants canvis estructurals possiblement no permeten observar una relació estable entre ambdues proteïnes.

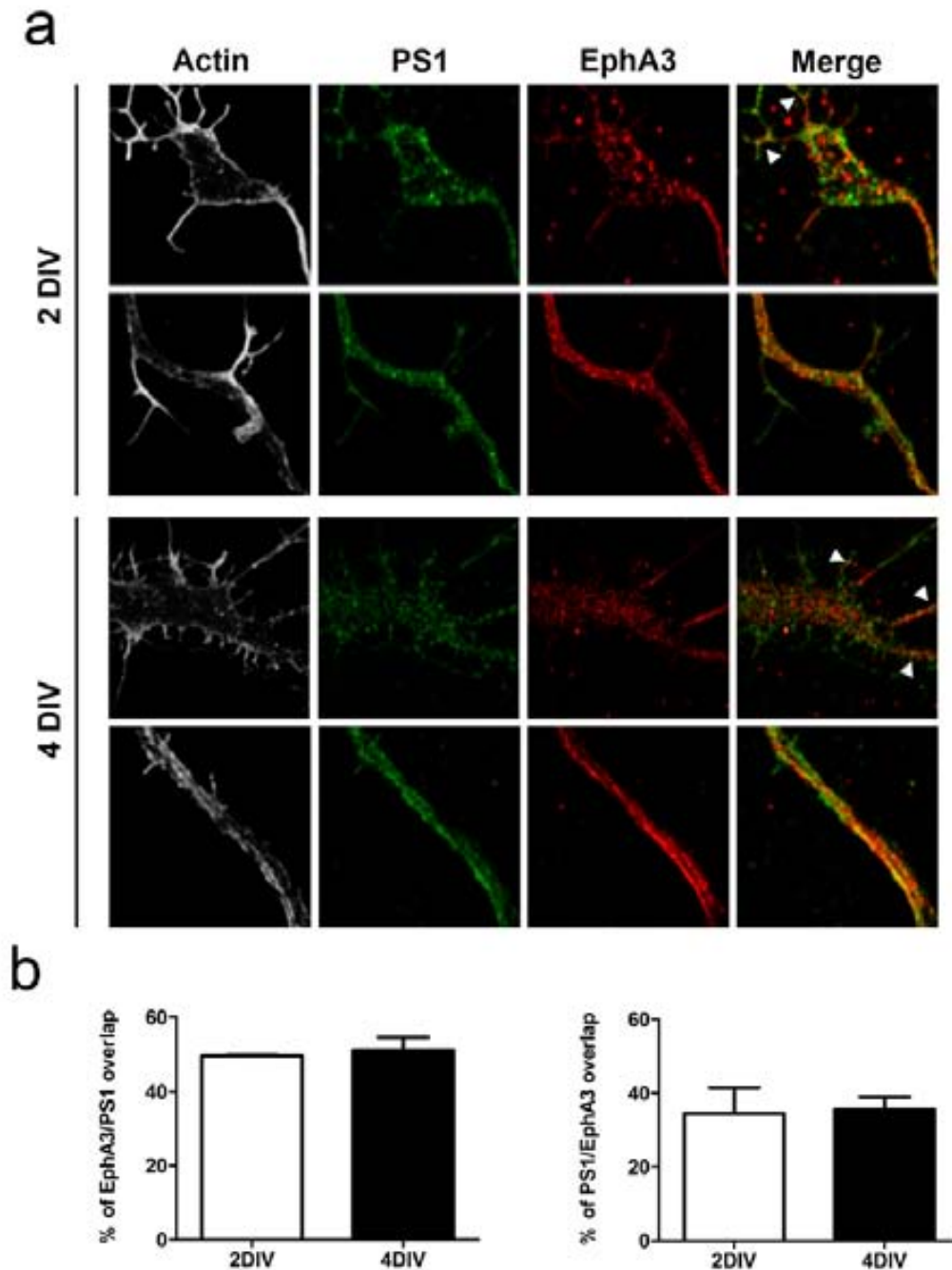


Figura 10 - PS1 i EphA3 col·localitzen en l'axó i el con de creixement de neurones hipocampals. Anàlisi de col·localització (a) entre presenilina-1 (PS1; verd) i el receptor EphA3 (EphA3; vermell) en neurones hipocampals PS1^{+/+} a 2DIV i 4DIV. Per delimitar l'estructura de l'axó i el con de creixement també es va realitzar un marcatge complementari amb faloidina (blanc). En el con de creixement PS1 i EphA3 col·localitzen de manera discreta en regions més extremes com les protusions de membrana (puntes de fletxa), mentre que en segment axonal la col·localització és significativa de forma contínua. (b) L'anàlisi dels píxels de col·localització permet determinar que es produeix una col·localització del 49.55% d'EphA3 amb PS1, i un 34.60% del total de PS1 amb EphA3. A 4DIV els resultats són similars, amb un percentatge de col·localització del 51.14% d'EphA3 amb PS1, mentre que només es produeix una col·localització del 35.55% del total de PS1 amb EphA3 a 4DIV.

A continuació, vam examinar la possible interacció de PS1 i EphA3 mitjançant estudis bioquímics de coimmunoprecipitació. Per realitzar aquests estudis vam sobreexpressar PS1 i EphA3 d'origen humà en cèl·lules HEK293T i després de 48 h, les cèl·lules van ser lisades i es va realitzar una coimmunoprecipitació amb anticòs contra PS1 (D39D1). L'anàlisi dels immunoprecipitats mitjançant Western blotting amb anticòs anti-EphA3 (C-19) va demostrar una interacció entre PS1 i EphA3 en cèl·lules que coexpressaven PS1 endògen o exògen (Figura 11). Per tal de discernir els dominis estructurals implicats en la interacció entre EphA3 i PS1, vam expressar transitòriament en cèl·lules HEK293T amb EphA3 o dos constructes d'EphA3, un amb la delecció del domini d'unió a lligand (Δ LBD) i l'altre amb la delecció del motiu d'unió PDZ (Δ PDZ). Els experiments de coimmunoprecipitació mostren una interacció entre PS1 i EphA3- Δ PDZ similar a EphA3. Pel contrari, EphA3- Δ LBD interacciona feblement amb PS1 (Figura 11). Aquests resultats indiquen que el domini d'unió a lligand és necessari per la correcta interacció entre EphA3 i PS1.

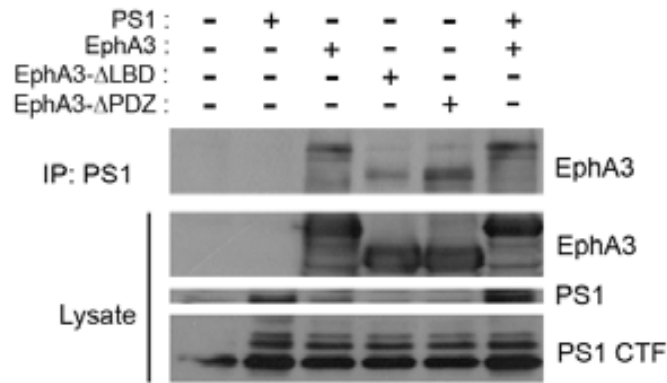


Figura 11 - El domini d'unió a lligand del receptor EphA3 és necessari per a la interacció directa amb PS1. Co-immunoprecipitació de PS1 i el receptor EphA3 en cèl·lules HEK293T. Les cèl·lules en cultiu van ser transfectades transitòriament durant 48h amb els vectors pcDNA3.1, PS1 humana, EphA3 humana, EphA3 amb la delecció del domini d'unió a lligand (Δ LBD), EphA3 amb la delecció del domini d'unió a motius PDZ (Δ PDZ) o simultàniament amb PS1 i EphA3. L'anàlisi per Western Blotting va revelar que PS1 interaccionava amb EphA3 i la forma mutada EphA3 (Δ PDZ), però que aquesta interacció disminuïa degut a la pèrdua del domini d'unió a lligand (EphA3 Δ LBD).

2. PS1 regula el processament d'EphA3

2.1 PS1/ γ -secretasa regula el processament d'EphA3 per PS en neurones hipocampals, HEK293T i fibroblasts

Els resultats anteriors indiquen que PS1 i EphA3 col-localitzen i interaccionen en cèl·lules en cultiu, suggerint que EphA3 podia ser un substrat de PS1/ γ -secretasa. Per comprovar la nostra hipòtesi, vam cultivar neurones hipocampals amb DAPT per tal d'inhibir l'activitat γ -secretasa. Per activar el receptor EphA3 les neurones també van ser tractades amb lligand ephrinA5-Fc en cluster durant 30 min. Immediatament després dels tractaments les neurones van ser lisades i a continuació es va realitzar una coimmunoprecipitació amb anticòs anti-

CrkII, una proteïna adaptadora que s'uneix a EphA3 un cop activat el receptor (Lawrenson et al., 2002). Com s'ha descrit prèviament, ephrinA5 indueix l'activació del receptor EphA3 després de 30 min, mesurada com l'augment de la immunoprecipitació entre CrkII i EphA3. Curiosament, l'anàlisi dels lisats cel·lulars mitjançant Western blotting amb un anticòs anti-EphA3 C-terminal va revelar la presència d'una banda (47 kDa) que s'acumula en les neurones tractades amb DAPT però no en les neurones tractades amb vehicle. Aquest fragment s'acumulava tan en presència o absència d'ephrinA5 (Figura 12). Com a control, en les cèl·lules tractades amb DAPT és va observar un acúmulo del fragment C-terminal de N-cadherina endògena, un conegut substrat del complex proteolític de PS/ γ -secretasa (Marambaud et al., 2003). Aquests resultats suggereixen que l'absència de l'activitat PS/ γ -secretasa en neurones produeix l'acúmulo d'un fragment C-terminal d'EphA3 (EphA3 CTF), que probablement correspon al producte de la proteòlisi per metaloproteases.

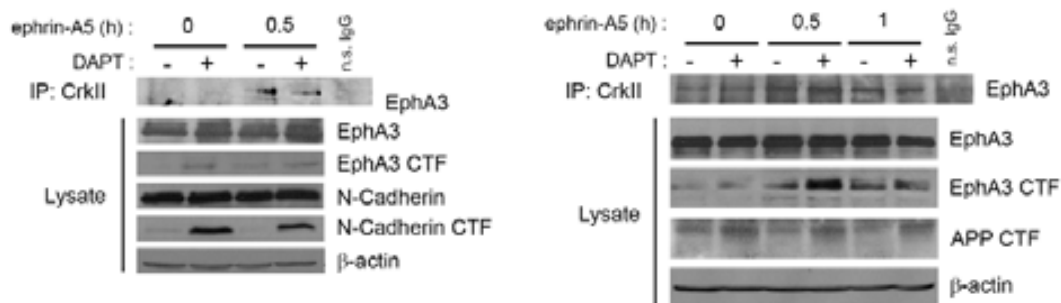


Figura 12 - L'activitat PS/ γ -secretasa és responsable de la proteòlisi constitutiva del receptor EphA3 en cèl·lules HEK293T i en neurones hipocàmpals. (a) Co-immunoprecipitació de la proteïna adaptadora CrkII i el receptor EphA3 en neurones hipocàmpals. Les cèl·lules van ser tractades amb vehicle (DMSO) o amb DAPT de 0-4DIV, i estimulades amb clústers de lligand ephrinA5-Fc durant 0 o 30 minuts prèviament a la lisi. L'anàlisi per Western blotting de la co-immunoprecipitació va mostrar que la proteïna adaptadora CrkII només s'uneix després de l'activació del receptor EphA3 amb lligand. Els lisats corresponents també mostren que la inhibició amb DAPT indueix l'acumulació d'un fragment C-terminal d'EphA3 que no es veu afectat per l'estímul amb ephrinA5, i un fragment de N-cadherina que tampoc es veu afectat per l'unió del lligand. **(b)** La co-immunoprecipitació de CrkII i EphA3 en cèl·lules HEK293T revela que la proteïna CrkII s'uneix a EphA3 de forma més pronunciada als 30min d'estímul. Els lisats analitzats per Western Blotting amb anticossos contra EphA3 i APP-CTF, revelen l'acumulació de fragments C-terminals en les cèl·lules tractades amb DAPT en comparació a les cèl·lules tractades amb vehicle.

De la mateixa manera, es va realitzar el mateix tipus d'experiment amb cèl·lules HEK293T transfectades transitòriament amb EphA3 durant 48 h. Les cèl·lules van ser tractades durant l'expressió d'EphA3 amb vehicle o amb DAPT, i també estimulades durant 30 min o 1 h amb el lligand ephrinA5 abans de ser lisades. De la mateixa manera que en les neurones, ephrinA5 produeix una activació màxima del receptor d'EphA3, mesurada com unió a CrkII, als 30 min en comparació amb les cèl·lules control (Figura 12). L'anàlisi per Western blotting mostra nivells d'EphA3 similars en els diferents tractaments, però l'acumulació d'un fragment

C-terminal d'EphA3 especialment en les cèl·lules tractades amb DAPT. En aquest cas, l'acumulació d'un fragment APP C-terminal, derivat del tall per α - γ -secretasa, en les neurones tractades amb DAPT independentment del lligand ephrinA5, va servir com a control de la inhibició de l'activitat γ -secretasa. Aquests resultats demostren que la inhibició de l'activitat PS/ γ -secretasa bloqueja el processament d'EphA3 independentment del lligand, produint l'acumulació d'un fragment C-terminal.

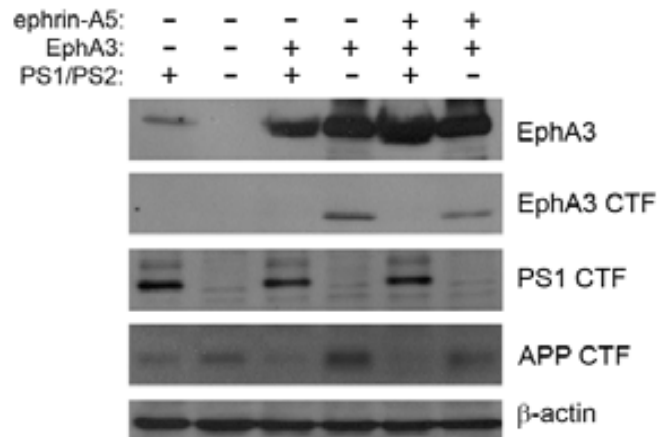


Figura 13 - L'activitat PS/ γ -secretasa és responsable de la proteòlisi constitutiva del receptor EphA3 en cèl·lules MEF. Fibroblasts derivats d'embrions de ratolí (MEF) control PS1/PS2 (PS^{+/+}) i deficients per l'expressió de PS (PS^{-/-}), van ser transfectats transitòriament amb EphA3 durant 48h i/o estimulats amb clústers de lligand ephrinA5-Fc. L'anàlisi per Western blotting revela l'acumulació d'un fragment C-terminal d'EphA3 i d'APP en les cèl·lules MEF PS^{-/-} amb o sense estímul amb ephrinA5-Fc.

A continuació, i per tal de corroborar els resultats anteriors, vam estudiar fibroblasts d'embrions de ratolins (MEF) PS^{+/+} i PS^{-/-} (de Strooper et al., 1999), transfectats transitòriament amb EphA3 i tractats en presència o absència de clústers d'ephrinA5 durant 30 min. En presència o absència d'ephrinA5, els fibroblasts PS^{-/-} acumulen un fragment C-terminal d'EphA3 en comparació amb els fibroblasts PS^{+/+}, així com un fragment C-terminal d'APP (Figura 13). Aquest resultat replica les observacions anteriors en neurones hipocampals i en cèl·lules HEK293T tractades amb DAPT, indicant que EphA3 és un substrat del complex PS/ γ -secretasa. A més, ephrinA5 no modifica significativament el processament d'EphA3 per PS/ γ -secretasa, i per tant es pot deduir que el processament del receptor es produeix tan en absència com en presència de lligand.

2.2 El complex PS1/ γ -secretasa genera un domini d'EphA3 intracel·lular

L'acumulació del fragment EphA3 CTF en neurones hipocampals i cèl·lules HEK293T tractades amb DAPT, i en fibroblasts PS^{-/-} suggereix la possibilitat que EphA3 pugui ser un substrat de PS1/ γ -secretasa. Per tal d'estudiar el producte intracel·lular de la proteòlisi

d'EphA3 (EphA3 ICD), vam realitzar un assaig d'activitat γ -secretasa *in vitro*, una tècnica àmpliament emprada per confirmar substrats de PS1/ γ -secretasa (MCLENDON et al., 2000; Sastre, 2001). Així, es van purificar membranes de cèl·lules HEK293T que sobreexpressaven el receptor EphA3, i es van realitzar assajos d'activitat γ -secretasa a diversos temps per a posteriorment recollir els sobrenedants, on es poden observar els productes de proteòlisi per PS/ γ -secretasa. Després de 48 h d'expressió vam realitzar un fraccionament subcel·lular i amb una fracció crua de membranes vam realitzar assajos d'activitat γ -secretasa a temps 0, 15, 60 i 120 min. Com a controls de l'activitat PS/ γ -secretasa les mostres van ser incubades amb vehicle (DMSO) o amb inhibidor DAPT.

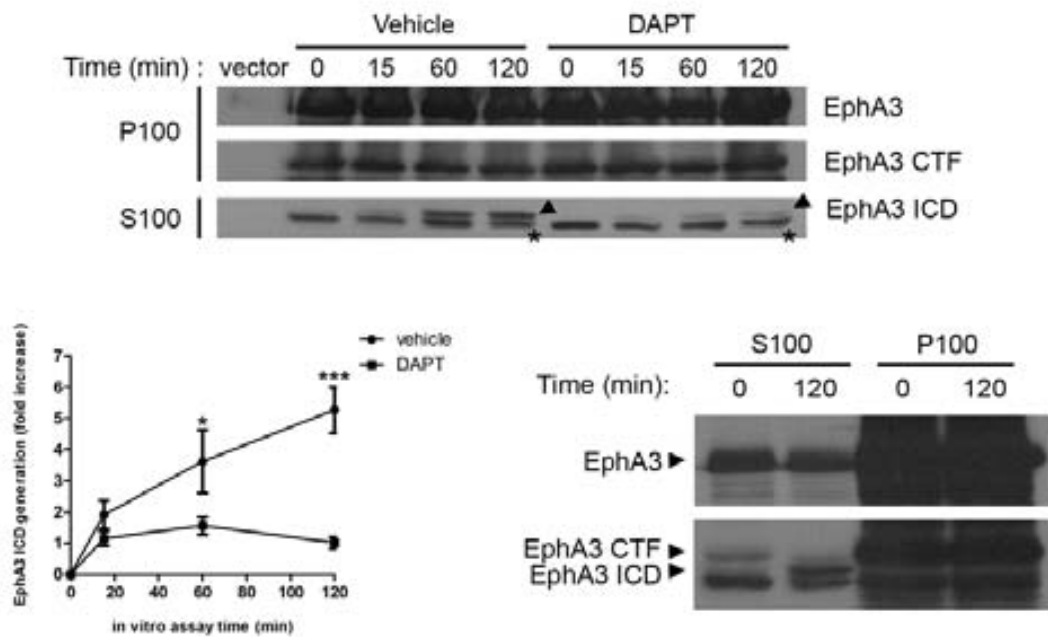


Figura 14 - La proteòlisi del receptor EphA3 per PS/ γ -secretasa induïx l'alliberament d'un fragment C-terminal del receptor EphA3 ICD. (a) Assaig *in vitro* γ -secretasa amb membranes purificades obtingudes a partir de cèl·lules HEK293T. Les cèl·lules van ser transfectades transitòriament durant 48h amb EphA3. La fracció P16 de membranes va ser incubada en presència de vehicle (DMSO) o DAPT durant 0, 15, 60 o 120 min. L'anàlisi per Western blotting va revelar que en la fracció insoluble P100 apareixia un fragment C-terminal (EphA3 CTF) el qual no variava entre els diversos temps. La fracció soluble S100 presenta una banda en les mostres tractades amb vehicle que (b) incrementa significativament a temps 60 i 120 min (EphA3 ICD; punta de fletxa), i que desapareix en les mostres tractades amb DAPT. En la fracció S100 també apareix una banda inespecífica invariable al llarg del temps (asterisc). (c) Assaig *in vitro* γ -secretasa amb membranes purificades obtingudes a partir de cèl·lules HEK293T. L'anàlisi per Western blotting va revelar que en la fracció S100 i P100 a temps 0 s'observava una banda de pes molecular similar (EphA3 CTF), mentre que en la fracció S100 però no en la fracció P100, a temps 120 min s'observava una banda de menor pes molecular (EphA3 ICD). Aquest resultat suggereix que EphA3 CTF és el precursor del fragment EphA3 ICD.

Els assajos d'activitat van ser analitzats per Western blotting amb anticòs contra la regió C-terminal d'EphA3. En la fracció no soluble (P100) corresponent a les membranes, s'observa la presència del receptor EphA3 i del fragment C-terminal de 47 kDa d'aquest receptor, sense

canvis significatius en els diferents temps (Figura 14). L'anàlisi bioquímico de la fracció soluble (S100) mostra la generació dependent del temps d'un fragment d'EphA3 C-terminal d'aproximadament 45 kDa (EphA3 ICD; Figura 14; punta de fletxa). La quantificació de diversos assajos independents mostra que aquest fragment està significativament disminuït en cèl·lules tractades amb DAPT, suggerint la dependència de l'activitat γ -secretasa. En l'anàlisi amb l'anticòs d'EphA3 també s'observa una banda de pes molecular inferior, present en tots els temps d'incubació i independent de la inhibició amb DAPT (Figura 14, asterisc), indicant que podria correspondre a un producte de proteòlisi d'EphA3 en altres posicions diferents al lloc γ -secretasa. L'anàlisi de la fracció S100 mostra que el fragments d'EphA3 CTF està disminuït en generar-se el fragment EphA3 ICD, de manera que la generació d'EphA3 ICD correlaciona amb la disminució de l'acumulació del fragment EphA3 CTF (Figura 14). Aquests resultats demostren que la proteòlisi d'EphA3 per una metaloproteasa genera un producte intermedi (EphA3 CTF) que és reconegut i proteolitzat per PS/ γ -secretasa, la qual genera un fragment soluble i intracel·lular EphA3 ICD.

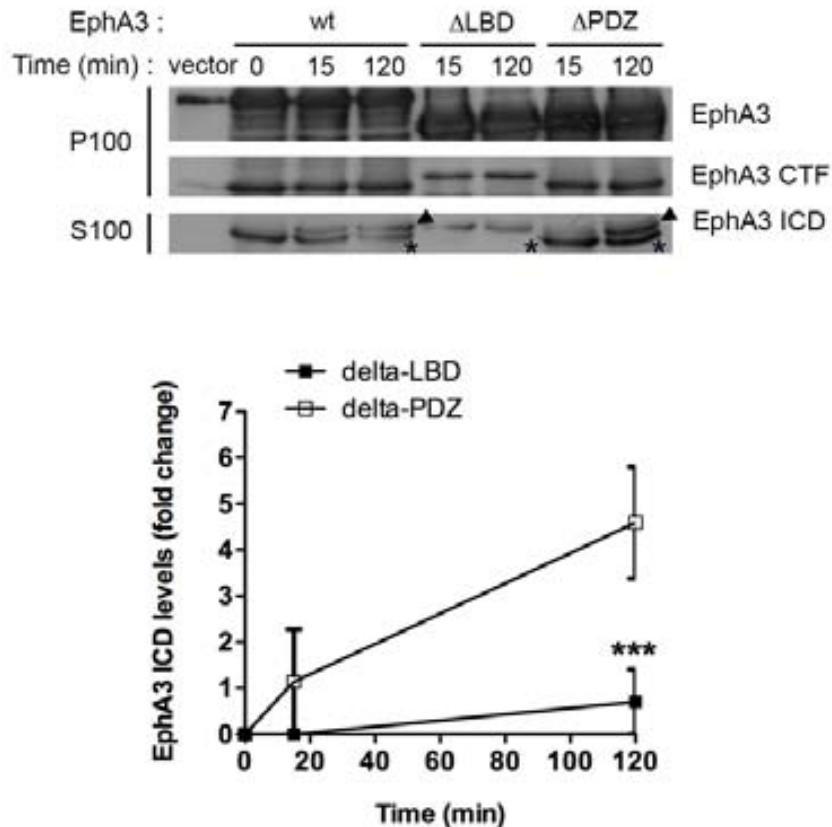


Figura 15 - L'absència del domini d'unió a lligand del receptor EphA3 inhibeix la proteòlisi per l'activitat PS/ γ -secretasa i l'alliberació del fragment EphA3 ICD. Assaig *in vitro* γ -secretasa amb membranes purificades obtingudes a partir de cèl·lules HEK293T. Les cèl·lules van ser transfectades transitòriament durant 48h amb EphA3, EphA3 Δ LBD o EphA3 Δ PDZ. La fracció P16 de membranes va ser incubada durant 0, 15 o 120 min per cada constructe. L'anàlisi per Western blotting va revelar que en la fracció soluble S100 de les membranes amb EphA3 o EphA3 Δ PDZ es generava, en quantitats significatives, un fragment (EphA3 ICD; punta de fletxa) després d'incubar-les durant 120 min. Per contra, les membranes amb EphA3 Δ LBD no generaven EphA3 ICD. En la fracció S100 també apareix una banda inespecífica invariable al llarg del temps (asterisc).

Els resultats d'interacció van mostrar que el domini d'unió al lligand d'EphA3 és necessari per a una òptima interacció amb PS1 (Figura 11). Per tal de comprovar si la unió del lligand era necessària per al correcte processament d'EphA3, es van expressar els constructes d'EphA3 WT, Δ LBD i Δ PDZ en cèl·lules HEK293T. A continuació vam realitzar assajos d'activitat γ -secretasa a temps 0, 15 i 120 min. L'anàlisi per Western blotting demostra que el EphA3 Δ PDZ genera EphA3 ICD de manera similar al EphA3 WT (Figura 15). Per contra, les cèl·lules que expressen EphA3 Δ LBD no presenten en la fracció soluble el fragment EphA3 ICD (Figura 15). En aquest cas, s'observa una banda d'un pes superior probablement corresponent a fragments C-terminal del Δ LBD que contenen tres repeticions del domini de reconeixement de l'hemaglutinina (HA), els quals provoquen el retard de la banda no específica en l'electroforesi. Aquests resultats permeten concloure que el domini d'unió a lligand és necessari per a l'òptima interacció i proteòlisi del receptor EphA3 per PS1/ γ -secretasa.

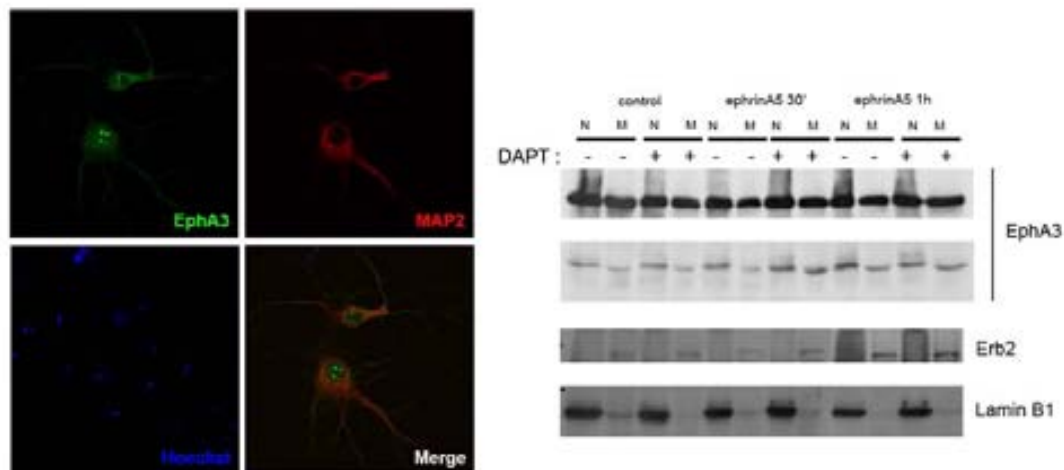


Figura 16 - Els fragments C-terminal del receptor EphA3 són presents en el nucli de neurones hipocampals. (a) Imatges de microscopia confocal d'una secció de neurones hipocampals en cultiu a 4DIV. Les neurones van ser marcades amb anticòs contra el receptor EphA3 (verd), marcador dendrític (MAP2, vermell) i marcatge de nuclis (Hoechst, blau). La combinació dels tres marcatges mostra la presència localitzada del receptor EphA3 en el nucli de les neurones hipocampals. **(b)** Cèl·lules HEK293T van ser transfectades transitòriament durant 48h amb un vector per EphA3 i posteriorment es va realitzar un fraccionament subcel·lular. El resultat de l'anàlisi per Western blotting revela un fragment C-terminal d'EphA3 en la fracció de membrana i nuclear de les cèl·lules. Les puresa de les fraccions es va comprovar utilitzant els marcadors Erb2 (fracció de membrana) i LaminB1 (fracció nuclear).

3. El domini C-terminal d'EphA3 es localitza en el nucli

Alguns fragments intracel·lulars derivats del processament per PS/ γ -secretasa es localitzen en el nucli, on poden regular l'expressió gènica, com és el cas del receptor Notch (Yoon and Gaiano, 2005) o receptors tirosina quinasa (Song et al., 2013). Per tal d'examinar la possible localització del receptor EphA3 en el nucli vam realitzar anàlisis per immunofluorescència en

neurones hipocampals mitjançant microscopia confocal. Sorprenentment, el receptor EphA3 es localitza en el citosol/membranes i en el nucli, tot i que degut a l'anticòs emprat no es pot saber si es tracta d'EphA3 o també d'algun dels seus productes processats (Figura 16). Per tal d'esbrinar si el marcatge nuclear d'EphA3 trobat en les neurones hipocampals podria correspondre a algun dels productes del processament per PS1/ γ -secretasa, es va dur a terme el fraccionament subcel·lular de cèl·lules HEK293T expressant EphA3. L'anàlisi per Western blotting mostra la presència d'EphA3 CTF tan en la fracció de membrana com en la nuclear. Malgrat això, no es va poder resoldre amb suficient resolució per poder distingir la presència del fragment EphA3 ICD. Tot i així, els fragments d'EphA3 semblen estar presents en el nucli, el que suggereix una funció d'EphA3 relacionada amb la regulació de l'expressió gènica.

4. EphA3 ICD regula el creixement axonal

EphA3 és un receptor transmembrana que té una especial rellevància en la mediació de l'elongació, repulsió i el direccionament axonal (Wilkinson, 2001). En base als resultats anteriors, vam decidir estudiar la funció del processament d'EphA3 per PS1/ γ -secretasa en la regulació del creixement axonal. Per tal d'estudiar si la interacció o proteòlisi d'EphA3 per PS1 afectava a la morfologia de l'axó vam examinar primer el paper d'EphA3 en el creixement axonal en neurones hipocampals en cultiu.

4.1 La inactivació d'EphA3 redueix el creixement axonal

En primer lloc vam dissenyar dues seqüències diferents d'un RNA d'interferència d'EphA3 inserits en una estructura de tipus *short-hairpin* (shRNA), i una seqüència control no-interferent (*scramble*). La seqüència *scramble* es va utilitzar com a control d'infecció lentiviral. Així doncs, tan els constructes shRNA com els constructes *scramble* van ser empaquetats en partícules lentivirals per tal d'aconseguir una alta eficiència d'infecció en les neurones hipocampals. Un dels avantatges que també comportava aquest sistema era el fet que l'expressió simultània de la proteïna fluorescent verda (GFP) en un segon *cassette* d'expressió ens permetia identificar les neurones on s'estava silenciant l'expressió d'EphA3. Per determinar l'eficiència del shRNA EphA3 es van infectar neurones a 0DIV durant 4DIV. Els resultats de Western blotting van mostrar que la seqüència shRNA-1 redueix significativament (60%) l'expressió d'EphA3 en comparació amb les cèl·lules control no infectades (Figura 17). Per contra, la seqüència shRNA-2 i el shRNA *scramble* no van ser capaces de modificar l'expressió d'EphA3. A partir d'aquest moment es va fer servir el lentivirus shRNA-1 EphA3 i *scramble* en els experiments posteriors.

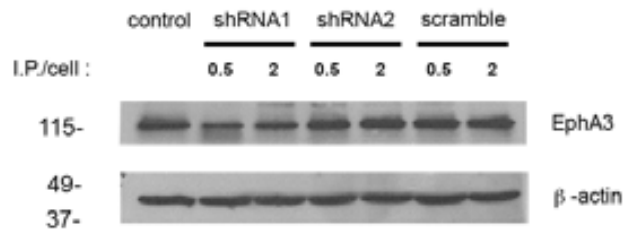


Figura 17 - La infecció amb partícules lentivirals amb expressió de EphA3 shRNA1 indueixen la disminució de l'expressió del receptor EphA3. Regulació de l'expressió del receptor EphA3 per *short-hairpin* RNA. Neurons hipocampals van ser infectades a 0DIV amb 0.5 o 2 partícules lentivirals infectives per cèl·lula. L'anàlisi per Western Blotting amb anticòs contra EphA3 mostra una disminució en l'expressió del receptor EphA3 en les neurones infectades amb EphA3-shRNA1 (shRNA1), però no mostra canvis en les neurones infectades amb EphA3-shRNA2 (shRNA2) o la seqüència control aleatòria (*scramble*).

Es van infectar neurones hipocampals de ratolins (E15.5) a 0DIV amb lentivirus d'EphA3 shRNA-1 o *scramble* (0.5 partícules infectives/cèl·lula), i simultàniament es van incubar amb vehicle o DAPT, i posteriorment es van tractar amb o sense lligand ephrinA5 durant 48 h. Les neurones es van analitzar mitjançant immunofluorescència amb anticòs anti-neurofilament (SMI312; vermell), mentre les neurones infectades amb GFP (verd). La quantificació de la longitud de l'axó mostra que la inactivació d'EphA3 amb shRNA-1 redueix significativament la llargada de l'axó (Figura R19). Aquest resultat és molt similar en neurones tractades amb vehicle o amb DAPT. De fet, la disminució del creixement axonal a l'inactivar EphA3 és el mateix que en les neurones tractades amb DAPT. Per contra, el creixement axonal no està afectat en les neurones infectades amb shRNA *scramble*, indicant que l'efecte sobre el creixement axonal no és un artefacte causat per la infecció amb partícules lentivirals.

Com prèviament s'havia descrit, l'activació del receptor EphA3 per ephrinA5 disminueix significativament la llargada de l'axó (Figura 18). En neurones infectades amb shRNA-1 EphA3, el lligand ephrinA5 no produeix un efecte sumatori. Aquest resultat està d'acord amb resultats previs, demostrant que l'activació d'EphA3 per ephrinA5 inhibeix el creixement axonal (Klein, 2001; O'Donnell et al., 2009), el que valida el model de creixement axonal emprat en aquest estudi. Prenent tots aquests resultats en conjunt, podem dir que de la mateixa manera que l'activitat γ -secretasa, l'expressió d'EphA3 és necessària per al correcte creixement axonal, i que la seva activació inhibeix aquest procés. A més, l'efecte de l'activitat γ -secretasa sobre el creixement axonal depèn de l'expressió d'EphA3, ja que l'efecte de la seva inhibició únicament s'observa en presència d'EphA3 (Figura 18).

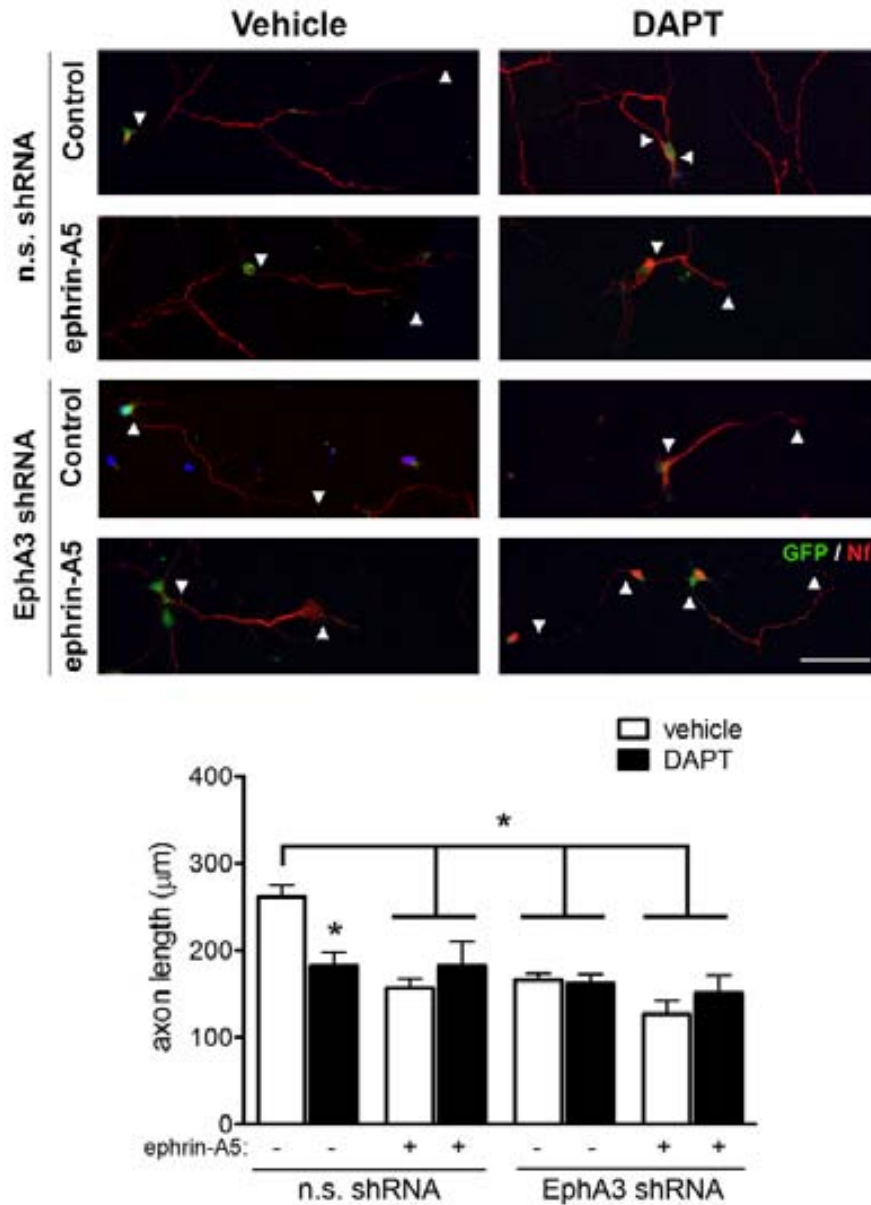


Figura 18 - La reducció de l'expressió del receptor EphA3 amb un shRNA induïx la disminució del creixement axonal en neurones hipocampals. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} a 4DIV. Les neurones van ser tractades de 0-4DIV amb vehicle (DMSO) o inhibidor de γ -secretasa (DAPT), i infectades a 0DIV amb partícules lentivirals EphA3 shRNA o amb una seqüència no específica (n.s. shRNA). Les neurones van ser tractades amb clústers de lligand ephrinA5-Fc durant 48h abans de fixar les mostres. L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per GFP (GFP, verd) mostra les neurones infectades amb les partícules lentivirals. El marcatge per neurofilament (Nf; vermell) revela una disminució significativa de la longitud axonal en les neurones infectades amb EphA3 shRNA, fossin tractades amb vehicle o DAPT, similar a la disminució produïda pel tractament amb DAPT en les neurones infectades amb n.s. shRNA. La reducció del creixement axonal induïda per EphA3 shRNA també és similar a la retracció de l'axó induïda pels clústers d'ephrinA5-Fc, tan en neurones tractades amb vehicle com amb DAPT.

4.2 L'EphA3 ICD reverteix el creixement axonal en neurones deficientes en PS1/ γ -secretasa

Els experiments anteriors demostren que l'expressió d'EphA3 és necessària per al creixement axonal i que l'efecte de l'activitat γ -secretasa sobre el creixement axonal depèn de l'expressió d'EphA3 en neurones hipocampals. Per tal d'estudiar si el fragment intracel·lular EphA3 ICD generat pel processament per PS1/ γ -secretasa d'EphA3 regula el creixement axonal, vam generar per clonació un fragment EphA3 ICD amb un *tag* amb tres repeticions de la seqüència *Flag* (3xFlag) utilitzant una aproximació bioinformàtica (veure mètodes 3.4.1). Aquest fragment s'hauria d'expressar en el citosol mimetitzant la situació fisiològica d'EphA3 ICD, ja que no es va incloure el pèptid senyal de translocació a la membrana. L'expressió d'aquest constructe en un vector de mamífer pcDNA3.1 en cèl·lules HEK293T mostra la presència d'un fragment d'EphA3 d'aproximadament 49 kDa (45 kDa més el pes molecular de la seqüència 3xFlag) (Figura 30). L'anàlisi per Western blotting d'EphA3 ICD-3xFlag utilitzant un anticòs anti-Flag, va verificar l'eficient expressió del fragment d'EphA3 ICD clonat (Figura 30). A part dels constructes anteriors, també vam subclonar el fragment EphA3 ICD en un vector amb una proteïna de fusió amb EGFP. EphA3 ICD-EGFP no era funcional en assajos d'activitat RhoA (veure més endavant) per la qual cosa es va descartar aquest constructe.

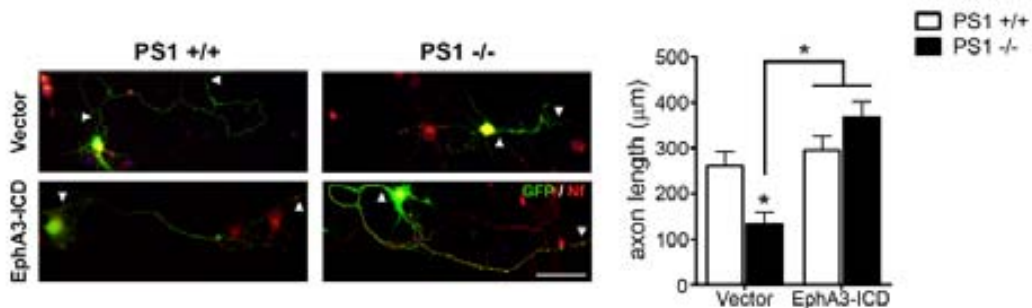


Figura 19 - L'expressió d'EphA3 ICD reverteix el creixement axonal en neurones deficientes en l'expressió de PS1. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} i PS1^{-/-} a 4DIV. Les neurones van ser co-transfectades transitòriament a 2DIV amb un vector d'EGFP i el constructe d'EphA3 ICD-3xFlag. L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per EGFP (GFP; verd) i neurofilament (Nf; vermell) va mostrar que l'expressió d'EphA3 ICD-3xFlag era suficient per revertir el creixement axonal en neurones PS1^{-/-}.

Per determinar el paper d'EphA3 ICD en el creixement axonal, neurones hipocampals control PS1^{+/+} i PS1^{-/-} (2DIV) cotransfectades amb EphA3 ICD i amb EGFP es van fixar als 4DIV abans de marcar i quantificar els axons amb anticòs anti-neurofilament. La quantificació de la llargada dels axons demostra que l'expressió d'EphA3 ICD no modifica significativament la morfologia axonal en neurones control (Figura 19). Per contra, l'expressió d'EphA3 ICD

reverteix significativament el creixement axonal en neurones PS1^{-/-} (Figura 19). Experiments similars es van realitzar en neurones tractades amb DAPT. Neurones hipocampals tractades amb DAPT o vehicle van ser cotransfectades (2DIV) amb EphA3 ICD i EGFP, i analitzades a 4DIV. Els resultats obtinguts mostren que l'expressió del fragment EphA3 ICD és capaç de recuperar el creixement axonal en neurones tractades amb DAPT (Figura 19). Així doncs, la generació d'EphA3 ICD sembla necessària per al creixement axonal, i per tant, vam hipotetitzar que l'expressió del receptor EphA3, en condicions d'inhibició de l'activitat γ -secretasa, no seria capaç de revertir els dèficits en el creixement axonal. Efectivament, l'anàlisi demostra que l'expressió d'EphA3 no és suficient per revertir els dèficits del creixement axonal causats per la inhibició de PS1/ γ -secretasa (Figura 20). Per tant, en conjunt aquests resultats suggereixen que el processament d'EphA3 per PS1/ γ -secretasa és necessari pel correcte creixement axonal.

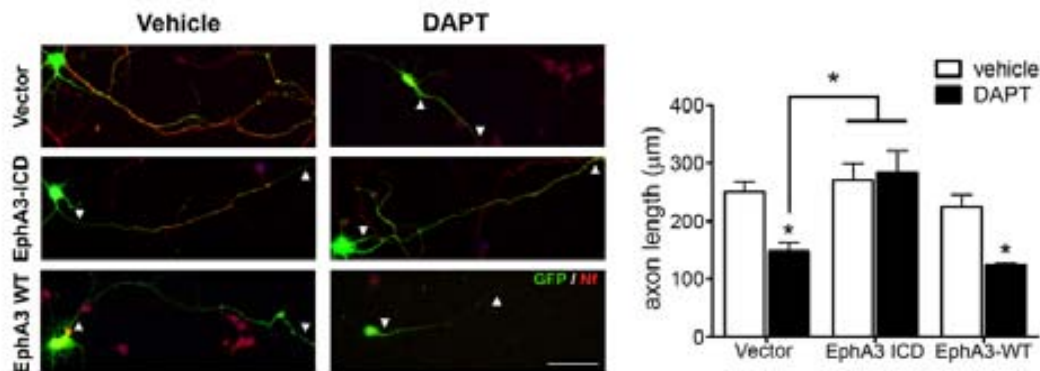


Figura 20 - L'expressió d'EphA3 ICD reverteix el creixement axonal en neurones deficientes en activitat PS/ γ -secretasa. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} a 4DIV. Les neurones van ser tractades de 0-4DIV amb vehicle (DMSO) o inhibidor de γ -secretasa (DAPT), i cotransfectades transitòriament a 2DIV amb un vector d'EGFP, el constructe d'EphA3 ICD-3xFlag o el receptor EphA3. L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per EGFP (GFP; verd) i neurofilament (Nf; vermell) va mostrar que l'expressió d'EphA3 ICD-3xFlag era suficient per revertir el creixement axonal en neurones tractades amb DAPT. Per contra, l'expressió del receptor EphA3 no va ser suficient per recuperar el correcte creixement axonal en les neurones tractades amb DAPT.

4.3 EphA3 ICD reverteix l'efecte de l'inactivació d'EphA3 sobre el creixement axonal

Els resultats anteriors van mostrar que el fragment EphA3 ICD era suficient per revertir el creixement axonal en neurones deficientes en PS1 o en activitat γ -secretasa. Per tal de comprovar si l'expressió d'EphA3 ICD reverteix el creixement axonal en neurones on l'expressió d'EphA3 està inhibida, vam infectar neurones hipocampals amb lentivirus EphA3 shRNA en presència de vehicle o DAPT (0 a 4DIV). A continuació es van transfectar les neurones amb vector control (pcDNA3.1-3xFlag) o amb EphA3 ICD a 2DIV. La quantificació dels axons demostra de nou que la inactivació d'EphA3 inhibeix significativament el creixement axonal a nivells similars del tractament amb DAPT (Figura 17 i 20). Curiosament,

EphA3 ICD augmenta significativament la llargada de l'axó tan en neurones que expressen EphA3 shRNA com en neurones tractades amb DAPT (Figura 21). A més, l'expressió d'EphA3 ICD és suficient per revertir l'efecte inhibitori del creixement axonal induït conjuntament per EphA3 shRNA i DAPT. Aquests resultats indiquen que el processament d'EphA3 per PS1/ γ -secretasa genera un fragment intracel·lular EphA3 ICD que regula el creixement axonal durant la maduració neuronal.

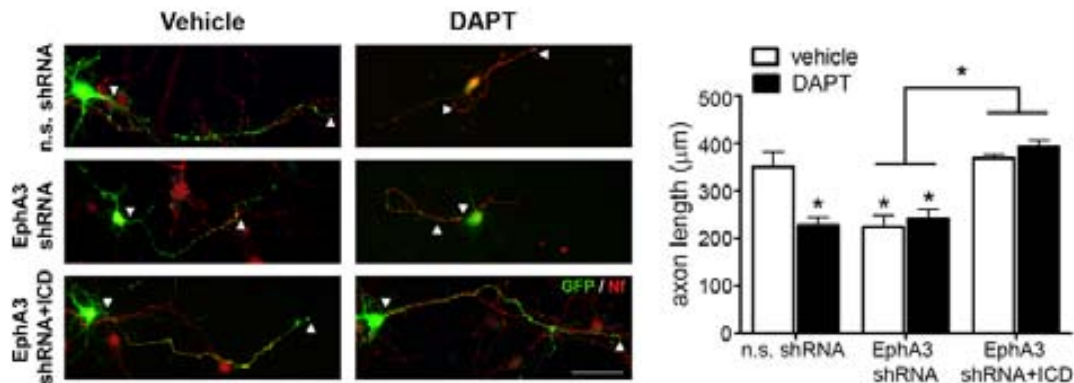


Figura 21 - L'expressió d'EphA3 ICD reverteix el creixement axonal en neurones deficientes en l'expressió del receptor EphA3. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} a 4DIV. Les neurones van ser tractades de 0-4DIV amb vehicle (DMSO) o inhibidor de γ -secretasa (DAPT), i infectades a 0DIV amb partícules lentivirals EphA3 shRNA o amb una seqüència no específica (n.s. shRNA). Les neurones van ser co-transfectades transitòriament a 2DIV amb un vector d'EGFP i el constructe d'EphA3 ICD-3xFlag. L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per GFP (GFP, verd) mostra les neurones infectades amb les partícules lentivirals. El marcatge per neurofilament (Nf; vermell) revela una disminució significativa de la longitud axonal en les neurones infectades amb EphA3 shRNA, fossin tractades amb vehicle o DAPT. En les neurones infectades amb EphA3 shRNA, la reducció del creixement axonal va poder ser rescatada amb l'expressió del constructe EphA3 ICD-3xFlag, tant en les neurones tractades amb vehicle com en les neurones tractades amb DAPT. Aquest resultat suggereix que l'expressió i el processament del receptor EphA3 és necessari per al creixement axonal.

4.4 Efecte de mutacions en EphA3 sobre el processament i el creixement axonal

Els resultats anteriors indicaven que al contrari que el domini PDZ, el domini d'unió a lligand (LBD) era necessari per l'òptima interacció i processament d'EphA3 per PS1/ γ -secretasa. Aquests resultats suggereixen que la delecció del LBD probablement inhibiria el creixement axonal degut a la falta de generació del fragment EphA3 ICD. Per tal d'investigar l'efecte d'aquests mutants d'EphA3 en el creixement axonal, vam infectar (0DIV) neurones hipocampals amb lentivirus EphA3 shRNA i al cap de dos dies (2DIV) van ser cotransfectades amb un vector d'EGFP i vectors amb EphA3 WT, Δ LBD o Δ PDZ. D'aquesta manera les neurones que expressen shRNA EphA3 poden ser identificades per l'expressió de GFP, la qual en el cas de l'infecció es veu limitada de manera lleu en el soma, mentre que les neurones cotransfectades amb EGFP presenten un marcatge intens al soma i en les neurites. S'ha de dir que el silenciament d'EphA3 murí pel shRNA és específic, ja que les

seqüències dissenyades contra l'RNA missatger són específiques per RNA murí, mentre que el receptor EphA3 sobreexpressat és d'origen humà. L'expressió d'EphA3 WT o Δ PDZ, els quals produeixen EphA3 ICD (Figura 15), reverteixen el creixement axonal en neurones deficientes en EphA3 (shRNA) (Figura 22). Per contra, l'expressió d'EphA3 Δ LBD no és capaç de revertir el dèficit en el creixement axonal causat per EphA3 shRNA. Aquest resultat indica que el processament d'EphA3 i la generació del fragment intracel·lular són necessaris pel creixement axonal.

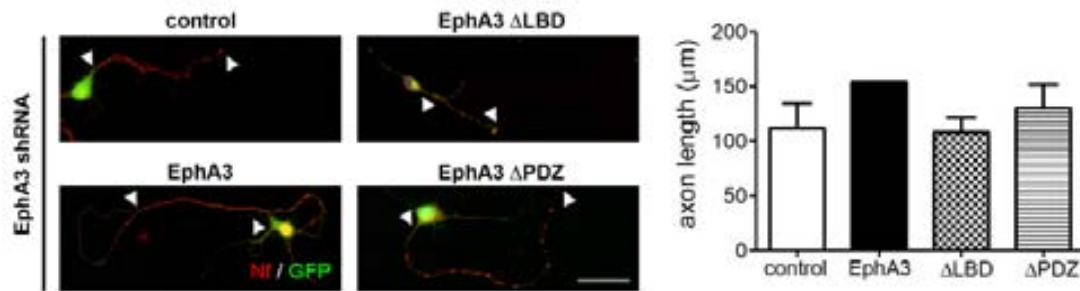


Figura 22 - Efecte en el creixement axonal dels dominis d'unió a lligand i d'unió a PDZ del receptor EphA3. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} a 4DIV. Les neurones van ser infectades a 0DIV amb partícules lentivirals EphA3 shRNA, i a 2DIV transfectades amb constructes que contenen el receptor EphA3 o les formes mutades EphA3 Δ LBD o EphA3 Δ PDZ. L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per GFP (GFP, verd) mostra les neurones infectades amb les partícules lentivirals. El marcatge per neurofilament (Nf; vermell) va mostrar que l'expressió d'EphA3 Δ LBD no és suficient per revertir la disminució del creixement axonal induïda per l'absència d'EphA3 *wild-type*. Per contra, l'expressió de la forma mutada EphA3 Δ PDZ sí és capaç de revertir el creixement axonal.

**CAPÍTOL III: EPHA3 ICD REGULA EL
CREIXEMENT AXONAL A
TRAVÉS DE LA VIA DE RHOA**

CAPÍTOL III: EPHA3 ICD REGULA EL CREIXEMENT AXONAL A TRAVÉS DE LA VIA DE RHOA

La unió del lligand d'efrina amb el seu receptor Eph entre dues cèl·lules properes activa de manera simultània vies de senyalització en ambdues cèl·lules. En el context del creixement i guia axonals, el con de creixement de l'axó en desenvolupament expressa el receptor d'Eph, mentre que les cèl·lules encarregades de guiar l'axó expressen el lligand. La unió del lligand al receptor d'efrina EphA localitzat al con de creixement inicia una cascada de senyalització que condueix a l'activació de la via de RhoA. Un cop activat RhoA s'indueix la contractibilitat de les fibres d'estrès presents en el con de creixement, esdeveniment que acaba conduint a la retracció axonal (Wahl et al., 2000) (Noren and Pasquale, 2004).

1. PS/γ-secretasa inhibeix l'activitat RhoA en neurones

Els experiments anteriors indiquen que el processament d'EphA3 per PS/γ-secretasa genera un fragment intracel·lular EphA3 ICD que actua promovent el creixement axonal. Degut a que l'activació del receptor EphA3 modula positivament la via de RhoA, induïnt la repulsió axonal, a continuació vam estudiar el paper de PS1/γ-secretasa en la regulació d'aquesta via.

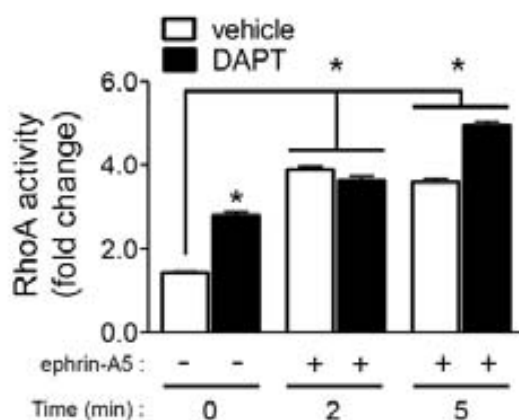


Figura 23 – La inhibició de l'activitat PS/γ-secretasa induïx l'augment de l'activitat RhoA. Anàlisi d'activitat RhoA. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} van ser tractades de 0-4DIV amb vehicle (DMSO) o inhibidor de γ-secretasa (DAPT), i estimulades amb clústers de lligand ephrinA5-Fc durant 0, 2 o 5 minuts prèviament a la lisi. L'anàlisi de l'activitat RhoA va mostrar que les neurones tractades només amb DAPT preservaven un augment intrínsec de l'activitat en comparació a les neurones tractades amb vehicle. L'estímul amb lligand ephrinA5-Fc va confirmar que l'activació de la via Eph-ephrin en les neurones induïx l'augment de l'activitat RhoA a 2 i 5 minuts, tan en les neurones tractades amb vehicle com en les neurones tractades amb DAPT.

Neurones hipocampals en cultiu van ser tractades amb vehicle o DAPT durant 4DIV i l'activitat RhoA va ser determinada amb un mètode d'ELISA. Com a control positiu vam utilitzar ephrinA5, el qual havíem demostrat prèviament que activava el receptor d'EphA3 (Figura 12) inhibint el creixement axonal (Figura 18). Degut a que l'activació de RhoA mediada per lligand és molt ràpida vam utilitzar temps molt curts d'estímul: 0, 2 i 5 min. Els

resultats de la mesura de l'activitat RhoA demostra que la unió d'ephrinA5 al seu receptor indueix una ràpida activació de RhoA als 2 i 5 min (Figura 23). El tractament amb DAPT incrementa significativament l'activitat RhoA tan en condicions basals com als 5 min de tractament amb ephrinA5 (Figura 23). Aquests resultats indiquen que la inhibició de l'activitat PS/ γ -secretasa activa la via de RhoA.

2. La inhibició de ROCK-1, reverteix el creixement axonal en neurones hipocampals deficients en PS/ γ -secretasa

Els nostres resultats suggereixen que la PS1 regulava positivament el creixement axonal a l'inhibir la via de RhoA. Per tal de comprovar aquesta hipòtesi a continuació vam examinar l'efecte de la inhibició de RhoA en el creixement axonal en el nostre model experimental, on la inhibició de PS/ γ -secretasa augmentava l'activitat d'aquesta via. Un efector de RhoA és la quinasa ROCK-1, la qual desencadena una cascada de senyalització que acaba en la reorganització del citoesquelet d'actina (Dickson, 2001; O'Donnell et al., 2009). Si ROCK-1 és activa s'indueix la senyalització per a la contracció del citoesquelet, i en el cas de l'axó indueix la retracció d'aquest.

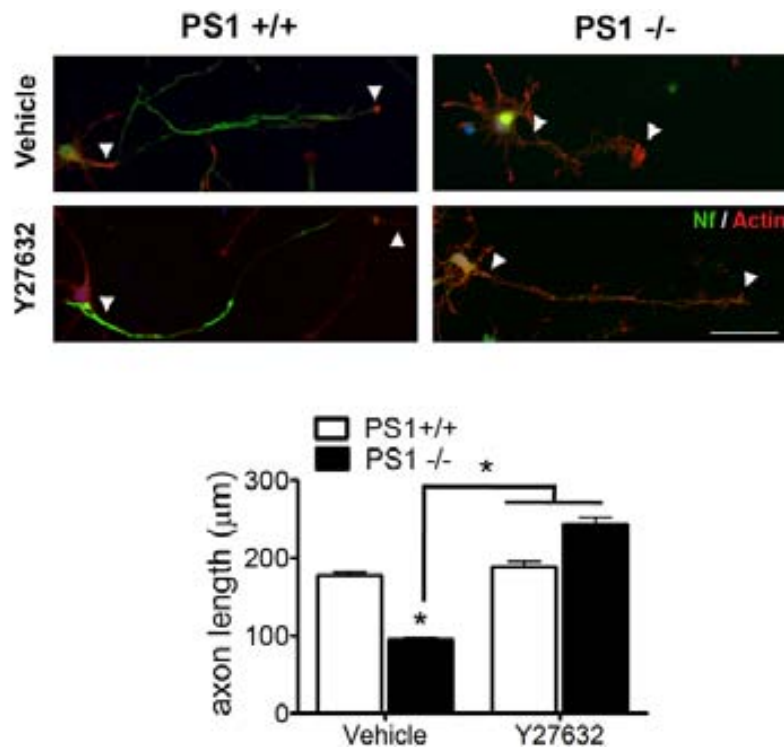


Figura 24 - La inhibició de ROCK reverteix el creixement axonal en neurones hipocampals deficients per l'expressió de PS1. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} i PS1^{-/-} a 4DIV. Les neurones van ser tractades a 2DIV amb vehicle (DMSO) o inhibidor de la quinasa ROCK (Y27632). L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per neurofilament (Nf; verd) i actina (Actin; vermell), revela una disminució significativa de la longitud axonal en les neurones PS1^{-/-} en comparació a les neurones control (PS1^{+/+}), la qual es revertida en les neurones PS1^{-/-} tractades amb Y27632. Aquest resultat suggereix que l'activitat RhoA podria estar implicada en la regulació del creixement axonal a través de PS1.

Així doncs, vam tractar cultius de neurones hipocampals control o $PS1^{-/-}$ a 2DIV i durant dos dies amb vehicle o un inhibidor específic de ROCK-1, Y27632 (Ahmed et al., 2009). A continuació es van detectar els axons amb anticòs anti-neurofilament, i les fibres d'actina amb faloïdina conjugada a un fluoròfor (Alexa594). Les neurones control tractades amb l'inhibidor Y27632 no presenten canvis significatius en la llargada de l'axó respecte les neurones tractades amb vehicle. Per contra, la inhibició de ROCK amb Y27632 reverteix significativament els dèficits en el creixement axonal en les neurones $PS1^{-/-}$ (Figura 24). De manera similar, l'inhibidor Y27632 reverteix el creixement axonal en neurones tractades amb DAPT (Figura 25), provocant una llargada de l'axó indistingible de les neurones control. En conjunt, aquests resultats suggereixen que l'activitat PS/ γ -secretasa està mediant l'elongació de l'axó a través de la via de RhoA.

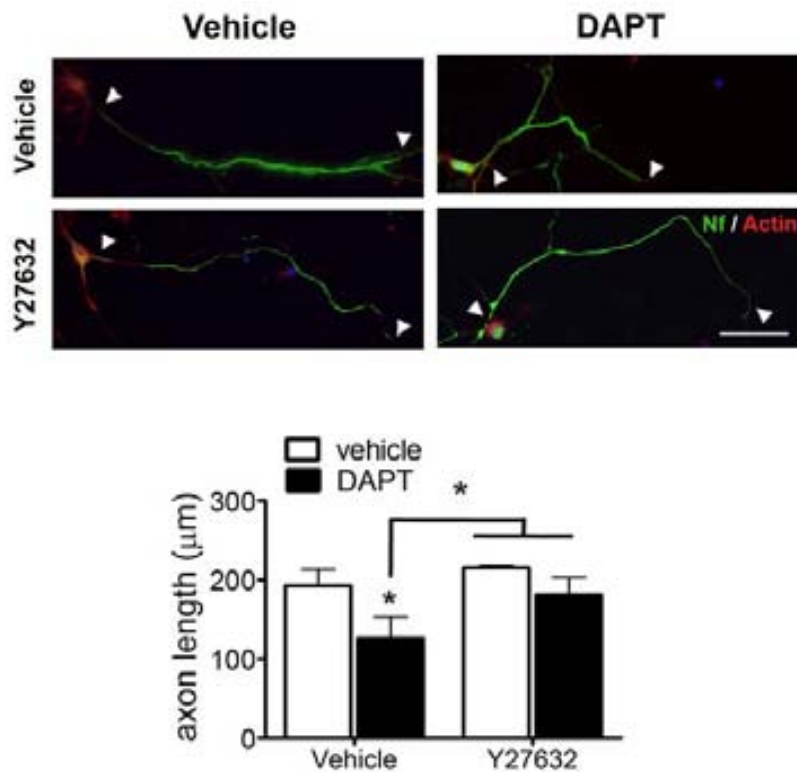


Figura 25 - La inhibició de ROCK reverteix el creixement axonal en neurones hipocampals deficients per l'activitat PS/ γ -secretasa. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions $PS1^{+/+}$ a 4DIV. Les neurones van ser tractades de 0-4DIV amb vehicle (DMSO) o inhibidor de γ -secretasa (DAPT), i a 2DIV amb vehicle (DMSO) o inhibidor de la quinasa ROCK (Y27632). L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per neurofilament (Nf; verd) i actina (Actin; vermell), revela una disminució significativa de la longitud axonal en les neurones tractades amb DAPT en comparació a les neurones tractades amb vehicle, la qual es revertida en les neurones tractades amb Y27632. Aquest resultat suggereix que l'activitat RhoA podria estar implicada en la regulació del creixement axonal a través de PS1/ γ -secretasa.

3. La inhibició genètica de RhoA reverteix el creixement axonal en neurones hipocampals deficients en PS/ γ -secretasa

Degut a que la inhibició de l'efector de RhoA, ROCK1, és una forma indirecta de comprovar la implicació de RhoA en el creixement axonal, vam decidir inhibir genèticament l'activitat de RhoA. Per aquest propòsit vam utilitzar cultius de neurones hipocampals, els quals van ser co-transfectats amb un constructe que expressava un mutant dominant negatiu de RhoA (RhoA T19N; RhoA DN) i un vector d'EGFP. L'expressió d'EGFP ens va permetre identificar les neurones que expressaven el constructe RhoA DN, i el marcatge amb anticòs anti-neurofilament ens va permetre detectar els axons. L'expressió de RhoA DN en neurones control no mostra diferències en la longitud axonal respecte les neurones transfectades amb vector control (Figura 26). En canvi, l'expressió de RhoA DN en neurones tractades amb DAPT produeix la reversió del creixement axonal (Figura 26). En resum, aquests resultats confirmen que l'activitat γ -secretasa de PS1 regula el creixement axonal a través de la via de RhoA.

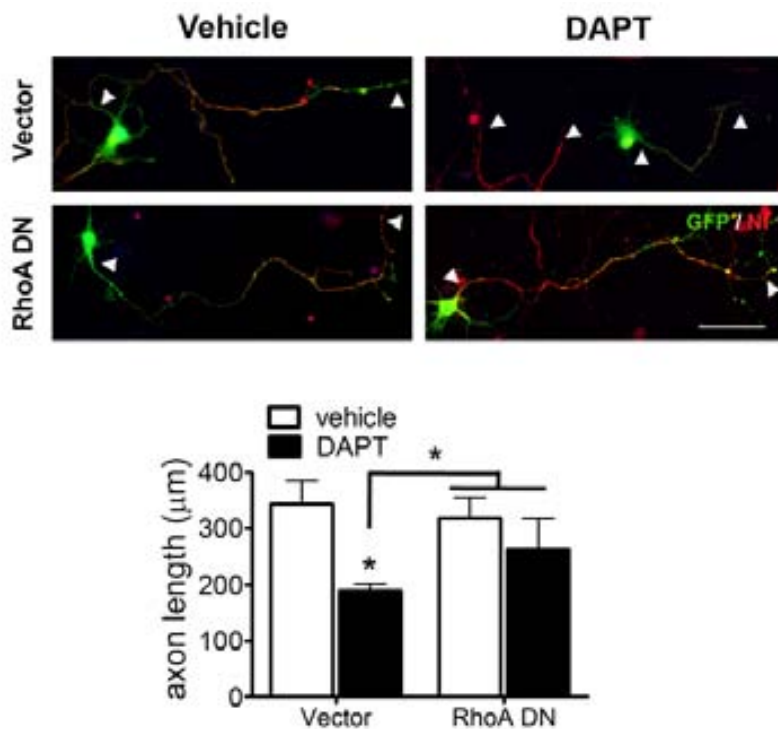


Figura 26 - La inhibició de RhoA reverteix el creixement axonal en neurones hipocampals deficients per l'activitat PS/ γ -secretasa. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} a 4DIV. Les neurones van ser tractades de 0-4DIV amb vehicle (DMSO) o inhibidor de γ -secretasa (DAPT), i co-transfectades transitòriament a 2DIV amb un vector d'EGFP i un constructe dominant negatiu de RhoA (RhoA DN) o un vector buit (Vector). L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per GFP (GFP, verd) mostra les neurones transfectades amb vector buit o RhoA DN. El marcatge per neurofilament (Nf; vermell) va mostrar que l'expressió de RhoA DN és suficient per revertir la disminució del creixement axonal induïda per DAPT. Aquest resultat suggereix que l'activitat de RhoA durant el creixement axonal podria ser regulada per PS1/ γ -secretasa.

4. Efecte de Rac1 i Cdc42 en el creixement axonal regulat per PS/ γ -secretasa

El creixement axonal està determinat per un equilibri temporal i espacial en la regulació de les Rho GTPases. Per cada via de senyalització activada existeixen diferents proteïnes encarregades de regular l'activitat Rho GTPasa. En general, és acceptat que el creixement de l'axó està promogut per l'activació de Cdc42 i Rac1, mentre que és requereix de forma simultània la inactivació de RhoA (Govek et al., 2005). Per tal de comprovar el paper de les altres Rho GTPases, Rac1 i Cdc42, en la regulació del creixement axonal per les PS, vam coexpressar mutants dominants negatius per Rac1 (Rac1 DN) i Cdc42 (Cdc42 DN) amb EGFP en les mateixes condicions anteriors. Els resultats obtinguts demostren que l'expressió de Rac1 DN o Cdc42 DN redueix significativament la longitud de l'axó respecte les neurones control (Figura 27). De fet, l'efecte dels constructes de Rac1 i Cdc42 DN és el mateix tan en les neurones tractades amb vehicle o DAPT. Per tant, aquests resultats indiquen que la disminució de l'activitat Rac1 o Cdc42 no és capaç de revertir l'efecte del creixement axonal induït per la inhibició de γ -secretasa.

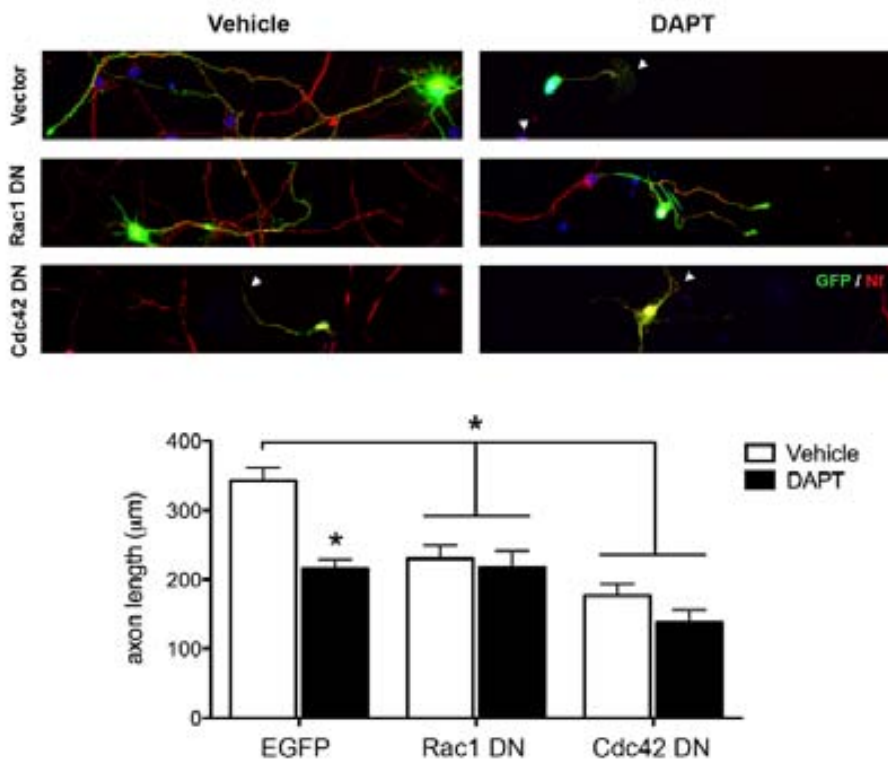


Figura 27 – La inhibició de l'activitat Rac1 o Cdc42 no és suficient per revertir el creixement axonal en neurones hipocampals. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} a 4DIV. Les neurones van ser tractades de 0-4DIV amb vehicle (DMSO) o inhibidor de γ -secretasa (DAPT), i co-transfectades transitòriament a 2DIV amb un vector d'EGFP i un constructe dominant negatiu de Rac1 (Rac1 DN), un dominant negatiu de Cdc42 (Cdc42 DN) o un vector buit (Vector). L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per GFP (GFP, verd) mostra les neurones transfectades amb vector buit, Rac1 DN o Cdc42 DN. El marcatge per neurofilament (Nf; vermell) va mostrar que l'expressió de Rac1 DN o Cdc42 DN no són capaços de revertir la disminució del creixement axonal induïda per DAPT. L'expressió de Rac1 i Cdc42 DN també indueixen una baixada en la longitud axonal en les neurones tractades amb vehicle.

Aquests resultats ens van portar a hipotitzar que potser Rac1 i Cdc42 estaven exercint una funció oposada a RhoA en el context de creixement axonal. Així doncs, un augment de l'activitat Rac1 o Cdc42 podria reertir l'efecte de la inhibició de l'activitat γ -secretasa sobre el creixement axonal. Per confirmar la nostra hipòtesi vam transfectar transitòriament neurones hipocampals amb vector i/o EGFP i Rac1 (Rac1 WT), Rac1 constitutivament actiu (Rac1 CA) o Cdc42 constitutivament actiu (Cdc42 CA). Els resultats mostren que l'expressió de Rac1 WT indueix una disminució del creixement axonal tan en les neurones tractades amb vehicle com les tractades amb DAPT (Figura 28).

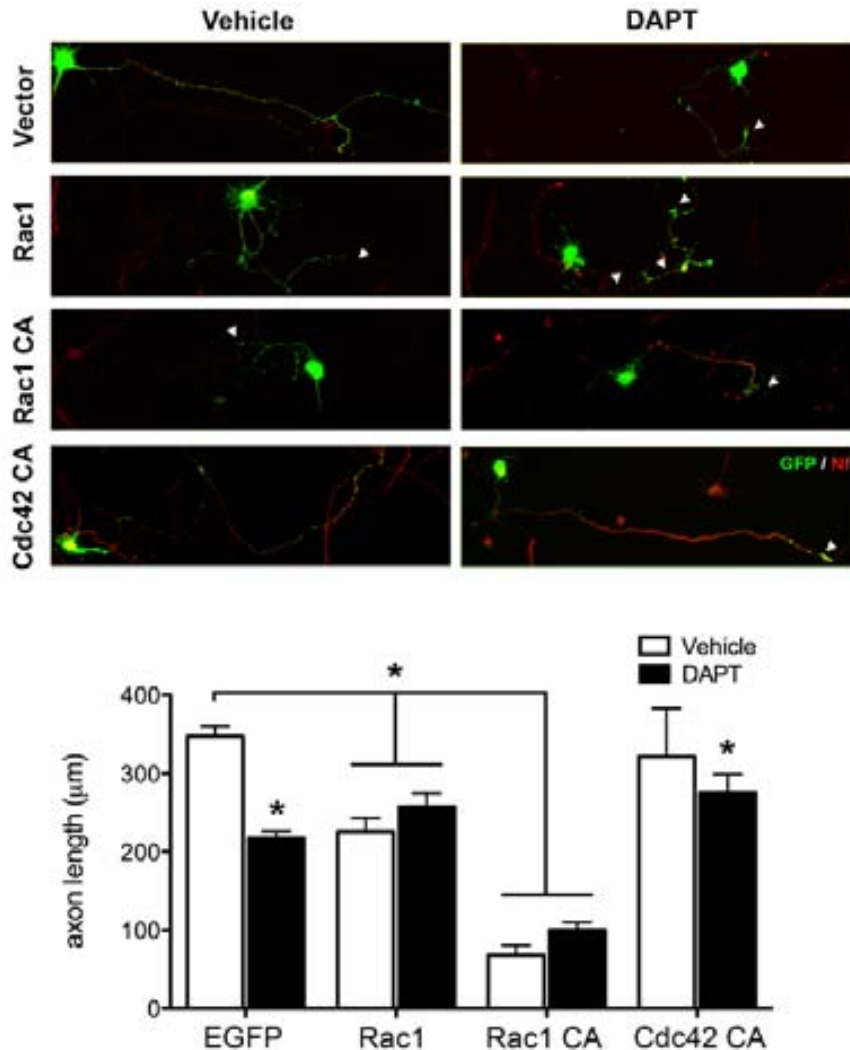


Figura 28 – La inducció de l'activitat Rac1 o Cdc42 no és suficient per revertir el creixement axonal en neurones hipocampals. Neurones primàries hipocampals provinents d'embrions PS1^{+/+} a 4DIV. Les neurones van ser tractades de 0-4DIV amb vehicle (DMSO) o inhibidor de γ -secretasa (DAPT), i co-transfectades transitòriament a 2DIV amb un vector d'EGFP i un vector amb Rac1 *wild-type* (Rac1), un constructe de Rac1 constitutivament activa (Rac1 CA), un constructe de Cdc42 constitutivament activa (Cdc42 CA), o un vector buit (Vector). L'anàlisi per immunofluorescència amb marcatge per GFP (GFP, verd) mostra les neurones transfectades amb vector buit, Rac1 CA o Cdc42 CA. El marcatge per neurofilament (Nf; vermell) va mostrar que l'expressió de Rac, o de forma més pronunciada en el cas de Rac1 CA, no són capaços de revertir la disminució del creixement axonal induïda per DAPT, i induïxen una reducció del creixement axonal en les neurones tractades amb vehicle. L'expressió de Cdc42 DN en neurones tractades amb DAPT només induïx una recuperació parcial del creixement axonal.

En el mateix sentit, l'expressió de Rac1 CA produeix un efecte encara més dràstic sobre el creixement axonal, reduint la longitud d'una manera encara més pronunciada que Rac1 WT o DAPT. Per contra, l'expressió de Cdc42 constitutivament actiu no indueix cap efecte en les neurones tractades amb vehicle, mentre que reverteix parcialment el creixement axonal en les neurones tractades amb DAPT. En conjunt, aquests resultats indiquen que Rac1 no és capaç de revertir la disminució del creixement axonal induït per la inhibició de PS/γ-secretasa, mentre que Cdc42 reverteix aquest efecte.

5. EphA3 ICD inhibeix l'activitat RhoA

Per tal de demostrar si la PS1 regula la via de senyalització de Rho GTPases a través d'EphA3, vam dissenyar un experiment en la línia cel·lular SK-N-AS derivada d'un neuroblastoma murí. Les cèl·lules es van transfectar amb vector o EphA3 ICD-3xFlag durant 48h abans de tractar-les amb vehicle o àcid oleoil-L-α-lisofosfatídic (LPA) durant 5 min per tal d'activar RhoA, tal com s'ha observat prèviament (Kranenburg et al., 1999). L'expressió d'EphA3 ICD en cèl·lules SK-N-AS disminueix significativament l'activitat RhoA respecte de les cèl·lules control (Figura 29). Com a control, el LPA indueix l'activació de RhoA, tal com esperàvem, mentre que EphA3 ICD no afecta aquest augment. Aquests resultats demostren que el processament d'EphA3 per PS/γ-secretasa genera un fragment intracel·lular que regula negativament l'activitat RhoA, promovent el creixement axonal.

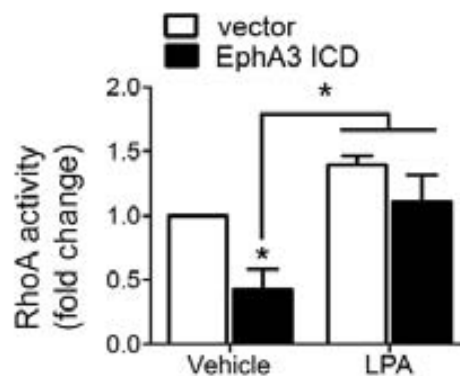


Figura 29 - L'expressió del fragment EphA3 ICD induïx la disminució de l'activitat RhoA. Anàlisi d'activitat RhoA. Cèl·lules SK-N-AS derivades de neuroblastoma humà van ser transfectades amb vector control pcDNA3.1 (vector) o amb el constructe EphA3 ICD-3xFlag (EphA3 ICD) durant 48h. Les cèl·lules van ser tractades amb àcid lisofosfatídic (LPA) o vehicle (DMSO) durant 5 min prèviament a la lisi cel·lular. L'anàlisi de l'activitat RhoA va mostrar que l'expressió d'EphA3 ICD-3xFlag induïa una disminució de l'activitat RhoA en les cèl·lules SK-N-AS. Aquest resultat suggereix que la regulació positiva del creixement axonal pel fragment intracel·lular EphA3 ICD podria ser regulat a través de RhoA. L'activació de RhoA a través de l'estímul per LPA, la qual regula creixement neurític en neurones, ens va confirmar que és una via també activa en les cèl·lules SK-N-AS.

6. El fragment EphA3 ICD interacciona amb les miosines

Per estudiar la funció fisiològica desenvolupada pel fragment EphA3 ICD, a continuació vam investigar possibles interaccions d'aquest fragment mitjançant coimmunoprecipitació i identificació per espectrometria de masses. La nostra aproximació va consistir en identificar quines proteïnes podrien interaccionar amb EphA3 ICD per regular el creixement axonal, i d'aquesta manera entendre quina era la seva funció.

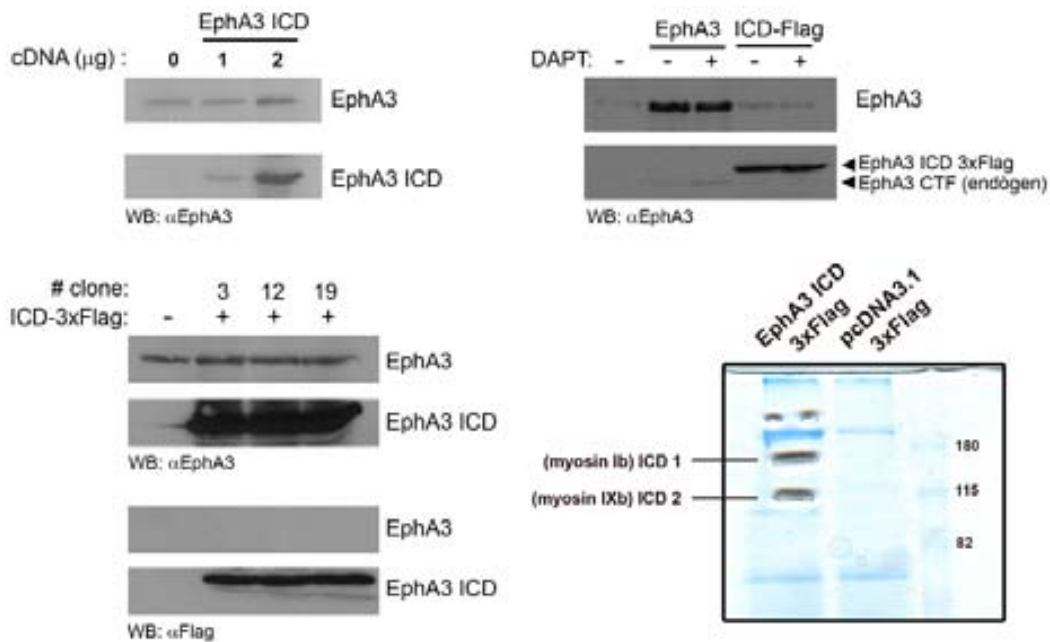


Figura 30 - (a) Cèl·lules HEK293T van ser transfectades transitòriament amb el constructe d'EphA3 ICD-3xHA durant 48h amb 0, 1 o 2 µg de vector. L'anàlisi per Western Blotting amb anticòs pel receptor EphA3 va mostrar la presència d'una banda de pes molecular corresponent al constructe EphA3 ICD-3xFLAG en les cèl·lules transfectades. **(b)** Cèl·lules HEK293T van ser transfectades transitòriament amb diversos clons del constructe d'EphA3 ICD-3xFlag durant 48h. L'anàlisi per Western Blotting utilitzant anticòs contra EphA3 va mostrar una banda C-terminal en tots els clons d'EphA3 ICD-3xFlag. La utilització d'anticòs contra l'epítop Flag també va mostrar que aquest fragment corresponia en tots els clons al constructe EphA3 ICD-3xFlag. **(c)** Cèl·lules HEK293T van ser transfectades transitòriament amb el receptor EphA3 o el constructe EphA3 ICD-3xFlag (ICD-Flag) i tractades amb vehicle (DMSO) o DAPT. L'anàlisi per Western Blotting amb anticòs contra EphA3 va mostrar un augment del pes molecular del fragment corresponent al constructe EphA3 ICD-3xFlag respecte el fragment C-terminal en les cèl·lules que expressaven el receptor EphA3, degut a la seqüència pels tres epítops Flag. **(d)** Electroforesi en gel

Per tal de dur a terme el nostre objectiu, vam cultivar cèl·lules HEK293T que expressaven transitòriament EphA3 ICD-3xFlag (descriu a mètodes 3.4.1; Figura 30) o cèl·lules control que expressaven el vector buit pcDNA-3xFlag (N-terminal). Vam deixar expressar els constructes durant 48 h i tot seguit vam lisar les cèl·lules i vam co-immunoprecipitar el fragment EphA3 ICD amb anticòs anti-Flag. El precipitat obtingut es va resoldre per electroforesi en gel d'acrilamida i posteriorment es van marcar les proteïnes purificades amb una tinció de coomassie col·loidal (Instant Blue), per tal d'identificar les proteïnes que interaccionaven amb

EphA3 ICD. Les proteïnes seleccionades per identificar es van escollir quan aquestes eren presents en les purificacions a partir de lisats cel·lulars que expressaven EphA3 ICD, però no es trobaven presents en els lisats cel·lulars que expressaven el vector buit (Figura 30). A continuació, les mostres van ser extretes dels gels d'acrilamida i identificades per MALDI-TOF (Servei de Proteòmica UAB). Els resultats van permetre identificar dues proteïnes candidates que s'unien a EphA3 ICD, la miosina-IIa i la miosina-1b (Figura 31). El més interessant va ser el cas de la Miosina-1b, la qual es troba expressada de forma significativa durant el desenvolupament axonal (Sherr et al., 1993), a la vegada que s'ha descrit que la seva funció és més significativa en el manteniment de la tensió de les membranes que no pas la de transport (Lewis and Bridgman, 1996).

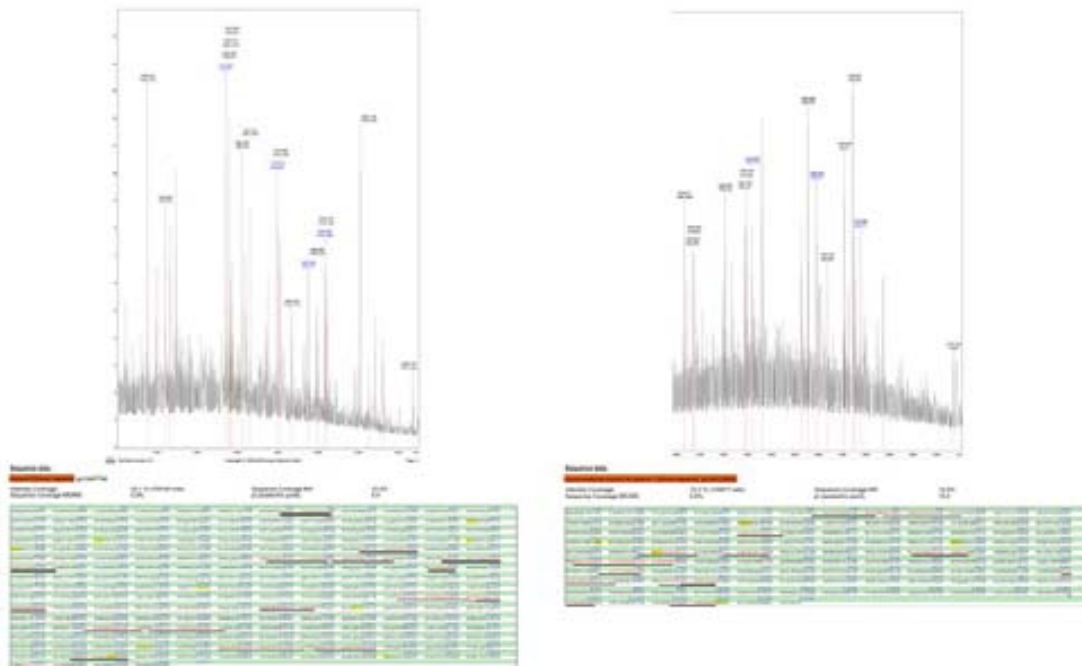


Figura 31 - EphA3 ICD interacciona amb la miosina-1b i la miosina-IIa. Gràfic representatiu de l'anàlisi per MALDI-TOF dels fragments ICD1 i ICD2 (Figura 30), corresponents a miosina-1b i miosina-IXb respectivament. La taula inferior mostra el reconeixement dels pèptids obtinguts per la tripsinització de les mostres en la base de dades MASCOT (Matrix Science).

DISCUSSIÓ

Les PS (PS1 i PS2), són el component catalític del complex γ -secretasa, un enzim que proteolitza proteïnes transmembrana de tipus I com APP, i per tant són les responsables de la generació del pèptid β -amiloide, el qual s'acumula en els cervells de malalts d'Alzheimer juntament amb la proteïna tau (Querfurth and LaFerla, 2010). Per altra banda el complex PS1/ γ -secretasa participa en processos biològics durant el desenvolupament embrionari i en estadis adults. Així, la proteòlisi del receptor Notch-1 per PS/ γ -secretasa en el domini transmembrana genera el fragment intracel·lular NICD, el qual és capaç de translocar al nucli, on s'associa amb la proteïna d'unió a DNA Csl per regular l'activació transcripcional (Kopan and Ilagan, 2009). A través de la regulació de la transcripció, NICD regula l'especificació cel·lular, la diferenciació, la proliferació i la supervivència neuronal (Selkoe and Kopan, 2003). La senyalització de Notch també està implicada en el manteniment dels progenitors neuronals, la diferenciació entre els llinatges neuronals o glials, la morfogènesi cerebral i la migració neuronal (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006). Per altra banda, la proteòlisi d'altres substrats com l'APP i el receptor ErbB4, generen els dominis intracel·lulars AICD i E4ICD respectivament, implicats en regulació transcripcional (Koo and Kopan, 2004), o en transcripció gènica, apoptosi i astrogènesi (Naresh, 2006) (Taula I1). Malgrat que hi ha prop de 100 substrats coneguts de PS/ γ -secretasa, la funció fisiològica dels dominis intracel·lulars generats per aquest complex enzimàtic és desconeguda en la majoria dels casos

PS1 regula el creixement axonal durant el desenvolupament embrionari

La deleció de PS1 durant el desenvolupament causa la mort prematura dels ratolins PS1^{-/-} durant la fase perinatal (Shen et al., 1997). Aquesta letalitat deguda a la deficiència de PS1 està associada a la disminució de la mida corporal, defectes en l'ossificació de la columna vertebral i les costelles i hemorràgies cerebrals. Els embrions deficients per PS1 presenten una desorganització de l'escorça cerebral i l'eixamplament dels ventricles (Shen et al., 1997). Aquesta pèrdua de capes cel·lulars es produeix per un dèficit en el nombre de progenitors neuronals per una sortida del cicle cel·lular en etapes inicials del desenvolupament (E10.5) (Handler et al., 2000). Tot i la pèrdua de cèl·lules en la zona ventricular del cervell (Figura 2), el nombre i la distribució de progenitors neuronals (nestina) a E15.5 en embrions PS1^{-/-}, és similar als embrions PS1^{+/+}. Aquesta aparent contradicció podria ser deguda als diferents estadis (E10.5 vs E15.5) analitzats en aquests dos estudis. A més, el marcatge amb NeuN, un marcador de neurones madures, tampoc presenta diferències significatives entre el ratolí PS1^{-/-} i els ratolins control en la zona ventricular (Figura 2). Aquest resultat coincideix amb un estudi previ, que demostra que no hi ha canvis en el nombre de cèl·lules postmitòtiques ni es produeix una disminució del nombre de cèl·lules nestina positives en embrions deficients en PS a E13.5 (Wen et al., 2004). Per altra banda, el marcatge amb doblecortina demostra una disminució de neurones immadures en la zona intermèdia entre la zona ventricular i la placa cortical, i una disminució més severa en la zona ventricular en els embrions PS1^{-/-} (Figura 2). Aquests resultats doncs, són coherents amb la disminució de la neurogènesi en

els embrions PS1^{-/-} (Handler et al., 2000) o en ratolins condicionals *knockout* per PS1 en etapes postnatales (Feng et al., 2001).

En l'hipocamp, tampoc no s'observen canvis en el marcatge per nestina en els ratolins PS1^{-/-} a E15.5, indicant que no hi ha canvis significatius en els progenitors neuronals respecte els ratolins control (Figura 3). Malgrat això, la longitud de les neurites dels progenitors neuronals (nestina positius) és menor. Això, podria indicar que PS1 està implicada en la maduració neuronal. Degut a que la nestina és un filament intermedi precursor del neurofilament (Zimmerman et al., 1994), aquest resultat suggereix que el desenvolupament de l'axó al llarg de la maduració neuronal està alterat en absència de PS1. En realitat, la reducció del marcatge per doblecortina en l'hipocamp dels ratolins PS1^{-/-}, sobretot en la zona on es produeix el major marcatge de cèl·lules positives per nestina, indica que tot i que es produeixen progenitors neuronals, hi ha una disminució en la neurogènesi durant el desenvolupament en absència de PS1 (Figura 3). De fet, l'absència de PS1 en neurones immadures i per tant de neurogènesi, disminueix el nombre de neurones postmitòtiques positives per MAP2 i NeuN en l'hipocamp. En conjunt, aquests resultats suggereixen que la PS1 regula la neurogènesi i morfologia aneuronal durant el desenvolupament embrionari en l'hipocamp.

La disminució de les neurites nestina positives en els ratolins PS1^{-/-} suggereix que la morfologia dels axons està afectada. Per comprovar-ho, vam realitzar anàlisis immunohistoquímics que ens van permetre l'observació dels axons en les regions ventricular i hipocampal d'embrions E15.5. Els resultats obtinguts amb el marcatge per neurofilament demostren una reducció en el nombre i la longitud dels axons en les neurones de la zona ventricular i l'hipocamp (Figures 2 i 4). De fet, en l'hipocamp dels embrions PS1^{-/-} el marcatge per neurofilament es limita al soma i a protrusions de mida molt reduïda. El marcatge per tau, una proteïna localitzada en els axons (Roth et al., 2012; Oliva et al.), demostra que efectivament es produeix una reducció del marcatge de tau en l'hipocamp dels embrions PS1^{-/-} (Figura 3). En la zona ventricular el marcatge per tau és gairebé inexistent, i només es present en la regió compresa entre la zona intermèdia i la placa cortical. Tot i que el paper de PS1 en el creixement axonal és desconegut, existeixen treballs previs que impliquen PS en la regulació del creixement neurític. En la línia cel·lular derivada de neuroblastoma N2a s'ha observat un augment del nombre i la longitud de protrusions neurítiques al sobreexpressar PS1 (Dowjat et al., 1999). De fet, la sobreexpressió de PS1 amb mutacions associades a Alzheimer familiar disminueix la longitud neurítica. Per contra, la sobreexpressió de PS1 produeix una reducció del creixement de les neurites en neurones hipocampals en cultiu, un efecte relacionat amb un augment de la translocació nuclear del fragment NICD de Notch1 (Pigino et al., 2001). Tot i així, en aquests treballs previs no discuteixen si l'efecte de les PS és en les dendrites o en els axons. Així, els nostres resultats demostren que la PS1 es necessària per al creixement axonal *in vivo* durant el desenvolupament neuronal.

L'activitat PS/ γ -secretasa és necessària pel creixement axonal

Per tal de poder estudiar els mecanismes moleculars regulats per la PS1 durant el creixement axonal vam utilitzar un model *in vitro* de neurones hipocampals en cultiu. Les neurones hipocampals d'embrions PS1^{-/-} presenten una disminució de la longitud dels axons a 4DIV confirmant que PS1 és necessària pel creixement axonal (Figura 5). Degut a que PS1 és capaç de regular diverses vies de senyalització de forma independent a la seva activitat γ -secretasa, com és el la via Wnt/ β -catenina (Soriano et al., 2001); i del receptor d'EGF (Rocher-Ros et al., 2010), vam estudiar si l'activitat γ -secretasa estava implicada en el creixement axonal. La inhibició farmacològica de l'activitat γ -secretasa amb DAPT causa la reducció de la longitud dels axons de manera similar a la deleció de PS1 en neurones hipocampals (Figura 6), el que indica que l'activitat γ -secretasa és necessària pel correcte creixement axonal. D'acord amb aquests resultats, treballs recents mostren que l'activitat γ -secretasa és necessària per a la correcta senyalització dels receptors DCC a través de les netrines, els seus lligands, en motoneurons. Quan DCC és processat per metal·loproteases en absència de PS/ γ -secretasa, es produeix l'acumulació d'un fragment C-terminal que induïx a una senyalització induïda per netrines errònia (Bai et al., 2011). Per altra banda, un mutant associat a FAD (PS1 Δ 9) el qual perd l'activitat γ -secretasa, no és capaç de revertir l'efecte en el creixement axonal en neurones PS1^{-/-} (Figura 8). En canvi, les mutacions M146L i C410Y, associades a FAD, tot i presentar una pèrdua de funció parcial de γ -secretasa en el tall ϵ en Notch1 i APP, van ser suficients per recuperar el creixement axonal en les neurones PS1^{-/-} (Song, 1999; Schroeter, 2003; Wiley et al., 2005). Tot i això, la pèrdua de funció parcial d'aquestes mutacions pot ser dependent del substrat. La mutació M146L no afecta el processament d'ephrinB2 o β -neurexina, però en canvi disminueix la proteòlisi de N-cadherina (Marambaud et al., 2003; Litterst et al., 2007; Saura et al., 2011). Per tant, els nostres resultats indiquen que una activitat γ -secretasa basal, és necessària pel correcte creixement axonal. La inhibició farmacològica de l'activitat de les metal·loproteases, induïx una reducció significativa de la longitud axonal en neurones hipocampals, el que indica que el processament seqüencial per metal·loproteases i posteriorment PS/ γ -secretasa d'una proteïna clau en creixement o guia axonal, està implicat en aquest procés. De fet, l'activitat de la metal·loproteasa *Kuzbanian*, un ortòleg de la metal·loproteasa ADAM10 en mamífers, és necessària per a l'extensió neurítica en *Drosophila* (Fambrough et al., 1996). A més, en cèl·lules ganglionars de retina l'activitat metal·loproteasa és necessària per l'extensió i per la guia axonal en resposta a estímuls extracel·lulars (Webber et al., 2002).

La regulació del creixement axonal per l'activitat γ -secretasa sembla que és específica i no pas un efecte generalitzat sobre la morfologia neuronal en general. Així, resultats realitzats en el laboratori prèviament (Dra. Labrada), mostren que la inhibició de l'activitat γ -secretasa induïa un augment de la llargada de les dendrites (Figura 7). Això demostra que la PS/ γ -secretasa regula la maduració dendrítica i axonal a través de diferents mecanismes moleculars.

PS1 localitza i interacciona amb el receptor d'efrina EphA3

El processament de diferents molècules de la matriu extracel·lular per diferents metal·loproteases regula la dinàmica del con de creixement durant el creixement axonal. L'expressió de MMP-2, una metal·loproteasa present en els cons de creixement, permet la degradació de diversos elements de la matriu que inhibeixen l'elongació de l'axó (Zuo et al.). A més, el processament per les metal·loproteases d'elements de la pròpia neurona és necessari durant la maduració axonal. De fet, el processament de lligands ephrinB2 a través de metal·loproteases, també s'ha associat a un segon tall seqüencial per PS/γ-secretasa (Georgakopoulos et al., 2006). La funció d'aquest processament per PS/γ-secretasa permet la generació d'un fragment intracel·lular d'ephrinB2, que s'ha demostrat que té capacitat per regular el citoesquelet d'actina a través de la interacció amb quinases com Src i Csk. EphrinB1 és un altre lligand de la família Eph que també és processat per activitat γ-secretasa després d'unir-se al seu receptor (Tomita et al., 2006). La proteolització del lligand ephrinB1 permet la inhibició de la resposta sobre el citoesquelet d'actina induïda per la unió a receptor Eph.

Així, l'associació de la família de metal·loproteases i desintegrines (ADAM) amb els receptors EphA3 i el lligand ephrinA2, i el processament posterior d'ephrinA2, és necessària per induir una resposta de repulsió en el con de creixement en neurones hipocampals (Hattori et al., 2000). Per primera vegada demostrem que EphA3 co-localitza i interacciona amb PS1 en els axons i de manera més restringida en el con de creixement en neurones hipocampals en cultiu (Figura 10a). Durant l'inici de l'elongació axonal en neurones en cultiu (2-4DIV) es produeix una col·localització d'aproximadament el 50% del receptor EphA3 amb PS1, el que indica que aquestes dues proteïnes s'expressen simultàniament en el mateix compartiment axonal. De fet, la ratio de col·localització del receptor EphA3 és superior a la ratio de col·localització de PS1 amb EphA3, el que és coherent amb les diferents funcions regulades per ambdues proteïnes. Així, la via de senyalització Eph-ephrin regula el citoesquelet més pròxim a la membrana citoplasmàtica en resposta al contacte cèl·lula-cèl·lula. Per contra, PS1 està implicada en la regulació de múltiples processos neuronals, ja sigui de forma dependent o independent de l'activitat γ-secretasa, i per tant és lògic que es trobi associada a múltiples proteïnes amb funcions diverses (Zhang et al., 2010; Kallhoff-Munoz et al.; Xia et al.). A més, els experiments de coimmunoprecipitació van demostrar que es produeix una interacció entre PS1 i EphA3, i que aquesta es dependent del domini d'unió a lligand d'EphA3 (Figura 11). Aquests resultats són coherents amb treballs previs que demostren que la interacció entre EphA3 i les metal·loproteases ADAM requereix el domini d'unió a lligand (Janes et al., 2005). De fet, PS1 interacciona amb la forma madura d'EphA3, el que suggereix que la interacció es produeix abans del processament de l'ectodomini d'EphA3. Aquest resultat és coherent amb treballs previs en que s'observa la interacció de PS1 i formes madures del receptor Notch1 o E-cadherina (Georgakopoulos et al., 1999; Ray et al., 1999) i PS1. Per altra banda, la interacció de PS1 amb EphA3 és independent del domini

PDZ en la cua citosòlica. Aquest resultat sembla lògic, ja que el domini PDZ s'ha associat a la formació de clústers de proteïnes sinàptiques (Dalva et al., 2000) o a l'associació de complexes de senyalització després de l'activació del receptor induïda per la unió a lligand (Hock et al., 1998; TORRES, 1998).

El receptor d'efrina EphA3 és un substrat de PS/ γ -secretasa

Un resultat clau d'aquesta tesi doctoral és que PS1/ γ -secretasa proteolitza el receptor EphA3. Així, l'inhibició farmacològica i genètica de PS1 induïx l'acumulació d'un fragment C-terminal d'EphA3 en neurones hipocàmpals (EphA3 CTF; Figura 12). En les neurones tractades amb DAPT i estímul per lligand ephrinA5 no s'observa una acumulació major de CTF que la produïda en les neurones no estimulades amb lligand. De manera similar, en diversos substrats de PS1/ γ -secretasa com EphB2, CD44, neurexin o N-cadherina, s'acumula un fragment C-terminal quan s'inhibeix farmacològicament o genèticament l'activitat γ -secretasa (Litterst et al., 2007; Saura et al., 2011; Lammich et al.; Restituito et al.). Els nostres resultats van ser corroborats en cèl·lules HEK293T tractades amb DAPT (Figura 12) i fibroblasts d'embrions de ratolí (MEF) *knockout* per PS1 i PS2, un model utilitzat extensament en l'estudi de substrats de γ -secretasa (Herreman et al., 2000; Saura et al., 2011). De fet, en aquests experiments tampoc es va observar un efecte sinèrgic en l'acumulació d'EphA3 CTF després de la unió d'ephrinA5. Això ens permet concloure que el processament del receptor EphA3 es produeix de forma constitutiva, i independent del lligand. Aquests resultats difereixen d'altres processaments com la proteòlisi del receptor EphB2 a través del complex PS/ γ -secretasa, ja que aquest processament requereix la unió del receptor amb el lligand ephrinB2, o un estímul induït per l'entrada de Ca^{2+} a través de receptors NMDA (Litterst et al., 2007).

La confirmació del processament d'EphA3 per PS1/ γ -secretasa va ser verificada en experiments d'activitat γ -secretasa *in vitro* (MCLENDON et al., 2000; Sastre, 2001). Així, l'acumulació d'un fragment C-terminal de pes molecular inferior a EphA3 CTF dependent de γ -secretasa en la fracció soluble, sembla correspondre a EphA3 ICD (Figura 14). Com bé havíem comentat anteriorment, el domini d'unió a lligand del receptor EphA3, però no el PDZ, és necessari per la formació d'un complex PS1/EphA3 que finalitza en el processament d'EphA3. A més, la disminució de la interacció PS1 i l'EphA3 deficient pel domini d'unió a lligand, causa la disminució del processament d'EphA3 (Figura 15). Així doncs, els nostres resultats semblen indicar que el receptor d'EphA3 s'associa amb PS1/ γ -secretasa a través del domini d'unió a lligand o bé aquest és necessari per la unió, per ser posteriorment processat i generar un fragment intracel·lular.

El processament d'EphA3 per PS/ γ -secretasa regula el creixement axonal

El receptor EphA3 està àmpliament expressat en el cervell durant el desenvolupament, en estadis inicials en les fibres neuronals de regions com el tàlam i la zona la zona intermèdia

cortical, o en estadis posteriors en la placa cortical, el cos callós i l'hipocamp (Kudo et al., 2005). De fet, estudis previs demostren que el silenciament d'EphA3 indueix una disminució del nombre d'axons que creuen el cos callós i arriben al còrtex contralateral, suggerint que EphA3 és necessari per a l'elongació axonal (Nishikimi et al., 2011). Malgrat tot, aquests estudis no deixaven clar si el receptor EphA3 regula el creixement axonal a través d'altres mecanismes diferents a la senyalització clàssica per activitat tirosina quinasa. Això és important ja que en realitat els receptors tirosina quinasa senyalitzen a través d'altres mecanismes que impliquen la proteòlisi del domini intracel·lular i la seva senyalització nuclear (Song et al., 2013).

D'acord amb el treball de Nishikimi *et al.*, la inactivació gènica d'EphA3 causa una disminució del creixement axonal, un efecte que no es potencia amb DAPT (Figura 18). A més, ephrinA5, el lligand amb més afinitat pel receptor EphA3 (Pasquale, 1997; Lawrenson et al., 2002), no produeix un efecte sinèrgic el creixement axonal en aquestes condicions. Per tant, aquests resultats suggereixen que EphA3 és necessari durant el procés de creixement axonal. Més enllà, la sobreexpressió del receptor EphA3 en neurones tractades amb DAPT no reverteix el creixement axonal (Figura 20). En el mateix sentit, el mutant defectiu pel domini d'unió a lligand EphA3 Δ LBD que no es processa per PS1, no va ser capaç de revertir l'efecte sobre el creixement axonal induït per EphA3 shRNA (Figura 22). Pel contrari, la sobreexpressió d'EphA3 o EphA3 Δ PDZ, els quals són processats per PS1/ γ -secretasa, reverteixen el creixement axonal causat per la inactivació d'EphA3. Aquests resultats demostren que el processament proteolític d'EphA3 per PS1/ γ -secretasa és necessari per al creixement axonal.

El lloc de tall de PS1/ γ -secretasa i per tant, la seqüència d'EphA3 ICD va ser determinada bioinformàticament mitjançant l'alineament amb altres substrats de PS1 (Figura M6), un mètode utilitzat anteriorment en la determinació del lloc de tall de diversos substrats de γ -secretasa (Hemming et al., 2008). L'expressió d'EphA3 ICD va revertir eficientment el creixement axonal en neurones deficientes per PS1 o EphA3 (Figura 19-21). A més, el fet que EphA3 ICD, però no EphA3, sigui suficient per revertir els dèficits del creixement axonal en neurones on l'activitat γ -secretasa està inhibida, indica que el processament d'EphA3 per γ -secretasa és crític en aquest procés. Per tant, aquests resultats són coherents amb un model en què PS1/ γ -secretasa processa EphA3 de forma constitutiva per generar el domini intracel·lular EphA3 ICD, independentment de la senyalització del receptor, induint així el creixement de l'axó. Així doncs, aquest és un nou mecanisme de senyalització alternatiu als receptors tirosina quinasa (Song et al., 2013), pel qual la proteòlisi de EphA3 regula una funció biològica, el creixement axonal, independentment del lligand i la senyalització clàssica.

PS1/ γ -secretasa afavoreix el creixement axonal a través de RhoA

La contínua remodelació del citoesquelet és un procés fonamental durant el creixement axonal. El transport i assemblatge d'estructures de neurofilaments i microtúbuls permeten l'estabilització de l'axó (Hirokawa et al., 1984; He et al.; Yamada et al.) fins al con de

creixement, la zona dinàmica que actua com a sensor de les senyals extracel·lulars que indueixen o inhibeixen el creixement. La zona central del con de creixement està formada per microtúbuls, mentre que la zona perifèrica està formada per filaments d'actina organitzats en estructures en forma de fibres d'estrès, filopodies, o lamelipodies (Mueller, 1999). Les respostes als estímuls externs a través de receptors de membrana, com per exemple els receptors Eph, permeten transduir les senyals a l'interior de la cèl·lula per tal de regular el creixement axonal. Entre les molècules de senyalització que actuen reorganitzant el citoesquelet d'actina i que són activades pels receptors Eph hi trobem la família de les Rho GTPases. Així, l'activació dels receptors Eph per les efrines indueix el reclutament de diverses proteïnes adaptadores i senyalitzadores que finalment activen o les Rho GTPases (Murai and Pasquale, 2005). Una de les principals Rho GTPases implicades en el col·lapse del con de creixement és RhoA, la qual s'activa per la unió de la proteïna RhoGEF ephexin-1 a receptors Eph actius, a la vegada que Rac1 i Cdc42 s'inhibeixen (Shamah et al., 2001; Sahin et al., 2005). RhoA regula el creixement axonal, a l'activar la seva quinasa efectora ROCK. L'activació de ROCK indueix l'activació de la quinasa LIMK la qual inactiva la cofilina, un factor despolimeritzant d'actina (Hall and Lalli, 2010), o fosforila la cadena lleugera de la miosina (MLC), induint en ambdós casos al col·lapse del con de creixement (Govek et al., 2005).

Degut a que la família de les Rho GTPases és fonamental durant la regulació del creixement axonal, vam estudiar si la PS/ γ -secretasa regulava aquest procés a través de RhoA. La inhibició farmacològica de γ -secretasa indueix un augment significatiu de l'activitat RhoA (Figura 23), un resultat coherent amb l'observació de que els axons de les neurones deficientes per PS1 o tractades amb DAPT són més curts que els axons control. Aquest increment en l'activitat RhoA és similar a l'obtinguda amb ephrinA5, el qual té un efecte similar en la inhibició del creixement axonal (Figura 23 i 18). De fet, el processament dels receptors Eph per metal·loproteases i PS/ γ -secretasa finalitza la senyalització induïda per lligand (Bai and Pfaff, 2011; Klein, 2012). Així, aquest resultat suggereix que a diferència de la repulsió axonal durant la guia axonal, que requereix la unió Eph-ephrin de cèl·lules oposades, el processament d'EphA3 per PS/ γ -secretasa indueix el creixement axonal independentment de lligand. En suport del paper de PS en la regulació del creixement axonal, vam observar que la inhibició gènica i farmacològica de RhoA i ROCK respectivament, revertia les alteracions en l'axó causades per la inhibició de PS1/ γ -secretasa (Figura 24 i 25). Aquests resultats són coherents amb treballs previs on es demostra que la inhibició de ROCK indueix un augment de la longitud neurítica en diversos tipus neuronals (Wahl et al., 2000; Borisoff et al., 2003; Fournier et al., 2003). En resum, els nostres resultats indiquen que l'activitat γ -secretasa afavoreix el creixement axonal a l'inhibir la senyalització de RhoA.

Per altra banda, no està clar com PS1 regula altres proteïnes de la família de les Rho GTPases com Rac1 i Cdc42. Els nostres resultats demostren que Rac1 i dominants negatius o constitutivament actius de Rac1, tenen un efecte negatiu sobre el creixement axonal, i no

permeten recuperar la morfologia axonal en neurones tractades amb DAPT (Figura 27 i 28). De fet, treballs previs ja demostren la dificultat de regular el creixement axonal tan sols amb constructes amb Rac1 activa o inactiva, ja que la resposta de Rac és molt dependent de la via de senyalització activada *upstream*, fent que Rac s'associï a uns o altres efectors i per tant, generant respostes oposades (Lundquist et al., 2001; Hakeda-Suzuki et al., 2002; Ng et al., 2002). Per altra banda, un mutant constitutivament actiu de Cdc42 reverteix parcialment els dèficits en el creixement axonal causats per la inhibició de γ -secretasa (Figura 28). Aquest resultat és coherent amb estudis previs que demostren que Cdc42 és necessària des de l'inici durant el creixement axonal (Garvalov et al., 2007). De fet, les proteïnes efectores de Cdc42, N-WASP i IQGAP3, són necessàries per reorganitzar el citoesquelet d'actina i de microtúbuls, durant el creixement axonal en neurones hipocampals (Banzai et al., 2000; Wang et al., 2007). Tot i això, els nostres resultats suggereixen que PS1/ γ -secretasa afavoreix el creixement axonal a través de RhoA i independentment de Cdc42.

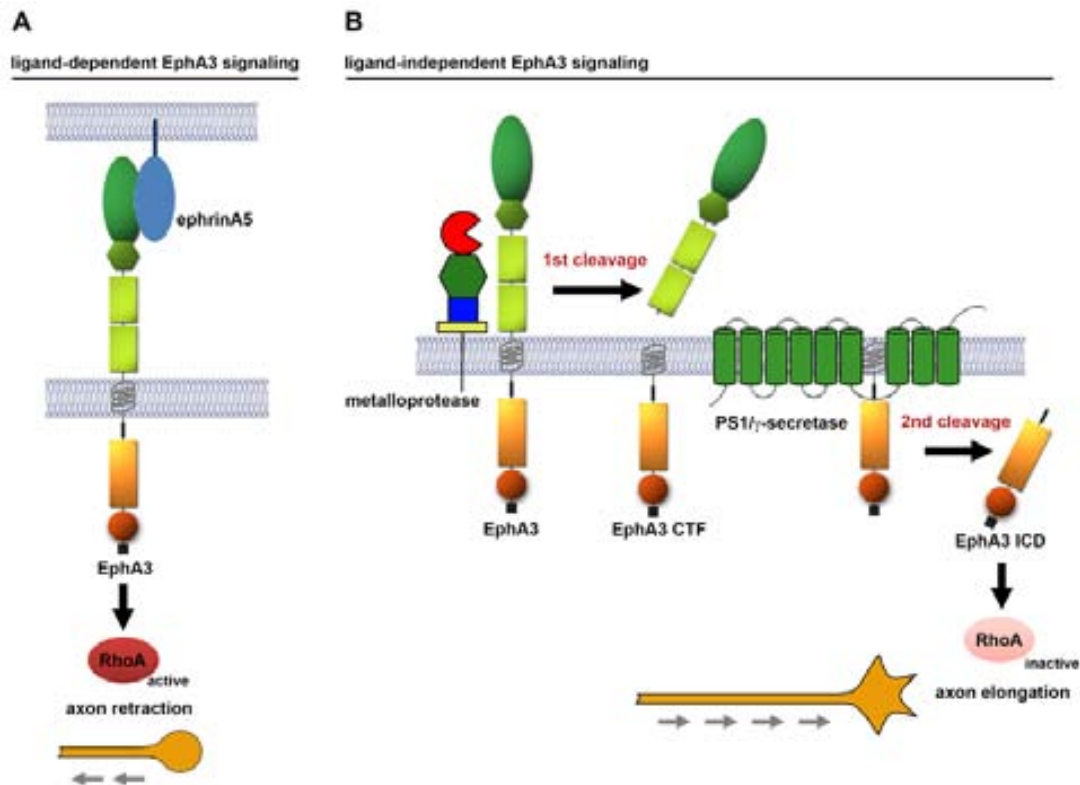


Figura D1 - Esquema representatiu de la regulació del creixement axonal regulat per PS1 a través d'EphA3. (a) La via clàssica de senyalització dels receptors Eph quan uneixen lligands d'efrina consisteix en l'activació de la via de RhoA GTPasa induint la retracció axonal. (b) En absència de lligand, el processament constitutiu del receptor EphA3 per PS1/ γ -secretasa allibera al citosol el domini intracel·lular EphA3 ICD el qual inhibeix l'activitat de RhoA GTPasa regulant positivament el creixement axonal.

En base als resultats obtinguts podem dir que PS1/ γ -secretasa regula el creixement axonal a través de RhoA i EphA3. En realitat, l'expressió d'EphA3 ICD inhibeix l'activitat RhoA de forma basal en cèl·lules d'origen neuronal (Figura 29), el que suggereix que el fragment EphA3 ICD regula el creixement axonal a través de la inhibició de l'activitat RhoA (Figura 20,

21 i 29). De fet, s'ha descrit que el fragment generat per PS/ γ -secretasa corresponent al domini intracel·lular d'EphA4 (EphA4 ICD), activa la Rho GTPasa Rac de forma independent de lligand (Inoue et al., 2009). Aquesta activació de Rac, permet a EphA4 ICD potenciar la maduració de les espines dendrítiques, una funció inversa a la del receptor sense processar, el qual indueix la retracció de les espines (Inoue et al., 2009). En resum, PS/ γ -secretasa processa el receptor EphA3 alliberant el domini intracel·lular EphA3 ICD al citosòl, el qual inhibeix RhoA induint el creixement axonal independentment de la senyalització Eph-ephrin (Figura D1).

EphA3 ICD interacciona amb la miosina-IIA i la miosina-IB

La formació de diferents estructures d'actina en el con de creixement és un esdeveniment claus durant el creixement o retracció de l'axó (Bradke, 1999; Gallo and Letourneau, 2003). La formació d'estructures en forma de lamelipodies en la zona perifèrica del con de creixement permet el manteniment i la formació de filaments paral·lels en forma de filopodies, encarregats de formar protrusions per fer avançar el con de creixement (Dent et al.). Entre la regió perifèrica formada per filaments d'actina, i la regió central del con de creixement formada per microtúbuls, s'ha proposat l'existència d'una zona de transició composta per arcs d'actina paral·lels al llindar del con de creixement. Els canvis que permeten la polimerització o despolimerització dels filaments d'actina, i per tant els canvis en l'estructura dels cons de creixement estan regulats per receptors de membrana que activen les Rho GTPases que acaben amb la regulació de les cadenes de miosina responsables de la contractilitat de la xarxa d'actina (Luo, 2002).

Amb l'objectiu d'investigar els possibles mecanismes cel·lulars regulats per EphA3 ICD durant la morfogènesi neuronal vam realitzar estudis de proteòmica. Els anàlisis per espectrometria de masses van identificar que EphA3 ICD s'uneix a la cadena pesada de les miosines MYH9, també coneguda com miosina-IIA; i la miosina-IB (Figura 30 i 31). Aquests resultats són en principi sorprenents ja que EphA3-ICD era capaç de regula negativament l'activitat RhoA, i per tant podíem esperar la interacció d'EphA3 ICD amb proteïnes de tipus RhoGAP. De fet, les miosines són proteïnes efectores reguladores del citoesquelet d'actina *downstream* de RhoA. Tot i així, les miosines són elements centrals en la regulació del creixement axonal en el con de creixement. De fet, els arcs formats per fibres d'actina empaquetades en la zona de transició es troben enriquits principalment per diverses isoformes de miosina, i actuen com a barreres per evitar la polimerització i invasió dels microtúbuls en la regió perifèrica del con de creixement (Vallee et al., 2009). Concretament, l'activitat motora de la isoforma miosina-IIA exerceix forces de tensió, i per tant, s'encarrega d'afavorir la retracció neurítica (Wylie, 2003). De forma oposada, l'activitat de la miosina-IIB s'encarrega de la formació de filopodies, les quals generen forces de tracció, i per tant potencia l'extensió del con de creixement i l'elongació de l'axó (Bridgman et al.). Així doncs, l'associació de EphA3 ICD amb la miosina-IIA, encarregada de la retracció neurítica

suggereix que l'alliberament d'EphA3 ICD al citosòl produiria una inhibició de la miosina-IIA, el que podria afavorir l'activitat de la miosina-IIB, que com s'ha descrit, induiria la formació de protrusions en el con de creixement i l'extensió de l'axó. De fet, seria interessant estudiar si EphA3 ICD regula l'activitat de la miosina-IIA durant el creixement axonal. Alternativament, és possible que tan l'alteració de la localització de la miosina-IIA en la zona de transició del con de creixement, com el bloqueig de l'associació a diverses proteïnes senyalitzadores, fossin responsables de l'efecte d'EphA3 ICD sobre el creixement axonal (Figura D2).

Per altra banda, és desconegut el paper que pot jugar l'associació del fragment EphA3 ICD amb la miosina-IB. De fet, el paper de la miosina-IB en els cons de creixement és encara àmpliament desconegut, la qual es troba distribuïda de forma puntuada adjacent a la membrana plasmàtica dorsal i ventral, i en punts d'alta concentració d'actina en la perifèria (Lewis and Bridgman, 1996). Altres treballs, en cèl·lules no neuronals la descriuen com una proteïna d'unió al citoesquelet d'actina en estructures compostes de lamel·lipodis en membranes amb plecs, complint funcions relacionades essencialment amb la contracció de l'actina en processos d'adhesió (Tang and Ostap, 2001). Així doncs, l'aprofundiment entre la interacció de miosina-IB i EphA3 ICD permetrà en un futur conèixer el paper de la miosina-IB en el creixement axonal durant el desenvolupament neuronal.

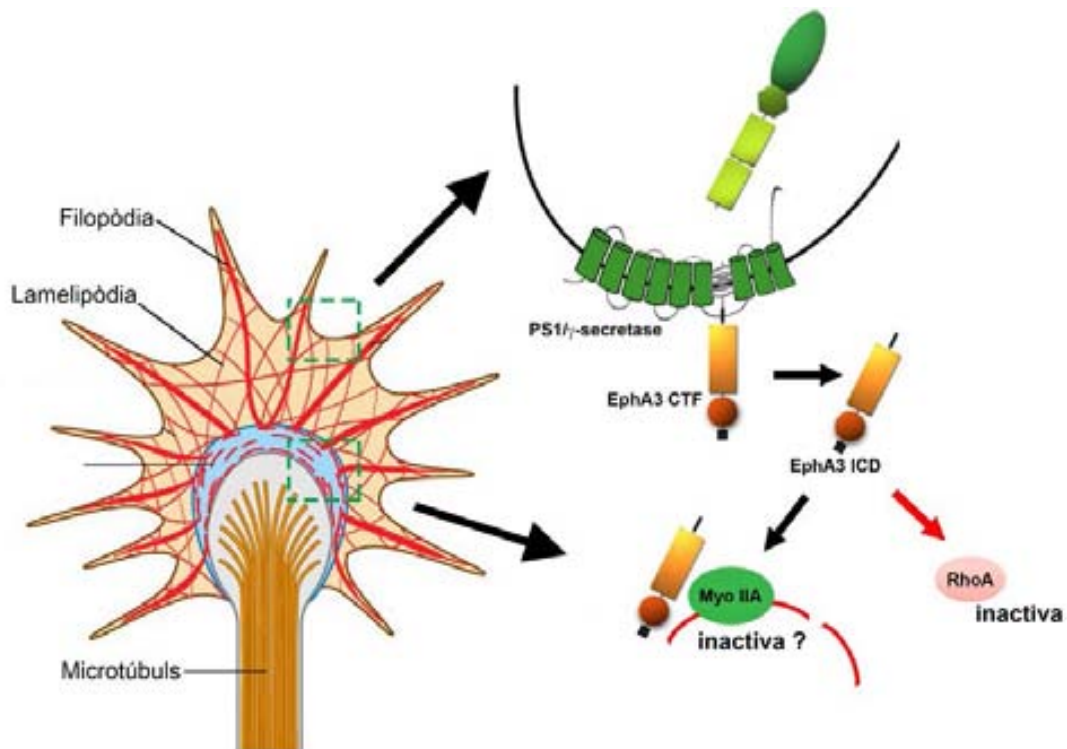


Figura D2 - Esquema representatiu de la regulació del citoesquelet d'actina a través d'EphA3 ICD en el con de creixement.

Possible interrelació de PS1 i EphA3 en neurodegeneració i càncer

La majoria de mutacions de PS en casos de FAD, estan associades a una reducció de l'activitat catalítica del complex γ -secretasa (de Strooper, 2007; Shen and Kelleher, 2007), i per tant també és possible que es trobin afectades altres vies de senyalització a part del processament d'APP. Dos exemples de vies de senyalització regulades per PS són Notch i Wnt/ β -catenina, les quals són imprescindibles durant el desenvolupament embrionari. Estudis previs van ser capaços de revertir la letalitat i defectes embrionaris dels ratolins PS1^{-/-} a l'expressar PS1 contenint la mutació lligada a Alzheimer (A246E) (Davis et al., 1998). De fet, els ratolins que expressen la mutació PS1 A246E presenten dèficits congènius com l'aprenentatge espacial, l'exploració i ansietat (Lalonde et al., 2003). En el mateix sentit, en ratolins *knockin* PS1 M146V s'ha observat l'aparició de dèficits congènius en edats molt inicials (Wang et al., 2004). Per altra banda, la inactivació de PS1 i PS2 en cervells adults, causa dèficits congènius, alteracions en la plasticitat sinàptica, una disminució del nombre de sinapsis i neurodegeneració (Saura et al., 2004). En realitat, s'ha postulat que els dèficits congènius en l'AD es poden associar a la disminució del nombre de sinapsis, situació que condueix a la pèrdua de funcionalitat dels circuits neuronals (Selkoe, 2002). Per tal de determinar quina és la rellevància de l'alteració del creixement axonal en l'establiment de sinapsis vam inhibir de forma crònica l'activitat γ -secretasa en neurones hipocampals en cultiu. Els nostres resultats demostren que la inhibició PS/ γ -secretasa redueix el nombre de sinapsis funcionals en neurones hipocampals en cultiu (Figura 9). Això suggereix que els dèficits en el creixement axonal podrien resultar en una disminució de la capacitat per formar sinapsis en les neurones. El fet que les mutacions associades a Alzheimer familiar inhibeixen parcialment PS/ γ -secretasa, permet pensar que la disminució en el creixement axonal podria afectar a la formació o establiment de sinapsis tan en el desenvolupament com en neurones de nova generació en adults. Aquest fet podria suggerir una implicació de PS/ γ -secretasa en la neurodegeneració sinàptica en AD.

Per altra banda, els lligands efrina i els receptors Eph tenen una àmplia funció com a molècules senyalitzadores implicades en adhesió, motilitat, creixement i morfologia cel·lular. Aquesta diversitat de funcions en diferents teixits ha fet que s'hagi descrit extensament la participació dels receptors Eph en processos oncogènics com en càncer de pit (EphA2, EphB4, EphA5, EphB6), colorectal (EphB2, EphB3, EphB4, EphA1, EphA2, EphA3, EphA7, EphA8), i pulmó (EphA2, EphA3, EphB3) (Brantley-Sieders, 2012). Més concretament, l'alteració en l'expressió d'EphA3 s'ha observat en diversos tumors com és el glioblastoma multiforme (Day et al., 2013), diferents tipus de leucèmia (Guan et al., 2011), en la majoria de càncers de pulmó (Zhuang et al., 2012), gàstrics (Xi et al., 2012) i càncers colorectals (Hinoue et al., 2009), o presentant mutacions en melanomes, càncers pancreàtics i carcinomes de cèl·lules escamoses de cap i coll (Lisabeth et al., 2012); en tots ells ja sigui com oncogen o gen supressor de tumors. De la mateixa manera, les PS no només estan relacionades amb neurodegeneració, sinó que la seva funció ha estat implicada en diversos

tumors. La deficiència en PS1 en pell causa l'hiperplàsia epidèrmica, hiperqueratosi i carcinomes escamosos (Xia et al., 2001) (Rocher-Ros et al., 2010), els quals estan associats a alteracions en la senyalització per Notch i β -catenina. Per últim, degut a la seva capacitat per regular el citoesquelet, les diferents isoformes de miosina-II han estat implicades en múltiples tipus de tumors. Així, la miosina-IIA està implicada en carcinomes de pit (Dulyaninova et al., 2007) (Betapudi, 2006), la invasió de gliomes cerebrals (Beadle et al., 2008), la migració de cèl·lules tumorals limfocitàries (Bastian et al., 2005), o s'ha utilitzat com a marcador metastàtic en carcinomes de pulmó (Maeda et al., 2008).

Un estudi recent classifica les principals mutacions en el receptor EphA3 segons la regió i tipus de tumor. Una regió del receptor EphA3 on es localitzen moltes mutacions és el domini extracel·lular. Així, la mutació D219V en la regió d'unió a lligand, i la mutació G518L, pròxima al domini transmembrana, presenten un augment de la localització del receptor en la superfície cel·lular (Lisabeth et al., 2012). Els nostres resultats demostren que el domini extracel·lular és necessari per a la interacció i processament mediat per γ -secretasa, i per tant un dèficit en aquesta interacció, per exemple degut a la presència de mutacions, podria ser clau per l'acumulació del receptor EphA3 en membrana. No obstant això, algunes mutacions indueixen una pèrdua de localització en membrana (Lisabeth et al., 2012). Seria interessant estudiar en el futur l'efecte d'aquestes mutacions en el processament d'EphA3 en cèl·lules tumorals. És interessant assenyalar que tan l'alteració de l'expressió com mutacions en EphA3 estan associades amb glioblastoma multiforme (Day et al., 2013), un tipus molt estès de glioma. En realitat, molts gliomes presenten alteracions en la localització de la miosina-IIA, el que pot donar lloc a alteracions en la migració d'aquest tipus de tumors (Beadle et al., 2008). En comparació a la miosina-IIB, la supressió de l'activitat de la miosina-IIA indueix una pèrdua de la capacitat migratòria de les cèl·lules tumorals (Betapudi, 2006; Beadle et al., 2008; Vicente-Manzanares et al., 2009), suggerint que una desregulació de l'activitat miosina-IIA podria ser responsable de l'augment de la capacitat invasiva en aquests tumors. Per tant, seria interessant conèixer el paper de PS/ γ -secretasa en la regulació d'EphA3 i miosina-IIA en aquests tipus de tumors.

En resum, el nostre treball descriu per primera vegada una interrelació entre PS1 (enzim), EphA3 (substrat) i miosina-IIA (proteïna efectora) sobre el citoesquelet cel·lular. Aquesta interrelació observada en els axons durant el desenvolupament i maduració neuronal obre un nou camp de recerca en malalties neurodegeneratives i en càncer.

CONCLUSIONS

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral s'ha arribat a les següents conclusions:

- La presenilina-1 és necessària per al creixement axonal *in vivo* durant el desenvolupament del sistema nerviós
- La presenilina-1 i l'activitat γ -secretasa són essencials pel creixement axonal en neurones hipocampals en cultiu
- El receptor EphA3 és proteolitzat pel complex PS1/ γ -secretasa
- El procesament d'EphA3 mediat per PS/ γ -secretasa genera un fragment intracel·lular EphA3 ICD necessari per al creixement axonal en neurones hipocampals
- La presenilina-1/ γ -secretasa inhibeix l'activitat RhoA GTPasa mitjançant el creixement axonal en neurones hipocampals. Per contra, la inhibició de RhoA i la seva proteïna efectora ROCK reverteixen els defectes del creixement axonal causats per la deficiència de PS/ γ -secretasa
- El fragment EphA3 ICD regula el creixement axonal a través de la reorganització del citoesquelet a l'inhibir l'activitat RhoA GTPasa i interaccionar amb miosines.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, F.J., Echeverri, C.J., Vallee, R.B., and Baas, P.W. (1998). Cytoplasmic dynein and dynactin are required for the transport of microtubules into the axon. *The Journal of Cell Biology* *140*, 391–401.
- Ahmed, Z., Berry, M., and Logan, A. (2009). ROCK inhibition promotes adult retinal ganglion cell neurite outgrowth only in the presence of growth promoting factors. *Molecular and Cellular Neurosciences* *42*, 128–133.
- Amato, S., Liu, X., Zheng, B., Cantley, L., Rakic, P., and Man, H.-Y. (2011). AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization. *Science (New York, NY)* *332*, 247–251.
- Andersen, S.S., and Bi, G.-Q. (2000). Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays* *22*, 172–179.
- Annaert, W.G., Lévesque, L., Craessaerts, K., Dierinck, I., Snellings, G., Westaway, D., George-Hyslop, P.S., Cordell, B., Fraser, P., and de Strooper, B. (1999). Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *The Journal of Cell Biology* *147*, 277–294.
- Antion, M.D., Christie, L.A., Bond, A.M., Dalva, M.B., and Contractor, A. (2010). Ephrin-B3 regulates glutamate receptor signaling at hippocampal synapses. *Molecular and Cellular Neurosciences* *45*, 378–388.
- Armstrong, J.N., Saganich, M.J., Xu, N.-J., Henkemeyer, M., Heinemann, S.F., and Contractor, A. (2006). B-Ephrin Reverse Signaling Is Required for NMDA-Independent Long-Term Potentiation of Mossy Fibers in the Hippocampus. *The Journal of \Ldots*.
- Arvanitis, D., and Davy, A. (2008). Eph/ephrin signaling: networks. *Genes & Development* *22*, 416–429.
- Atwal, J.K., Massie, B., Miller, F.D., and Kaplan, D.R. (2000). The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* *27*, 265–277.
- Atwal, J.K., Singh, K.K., Tessier-Lavigne, M., Miller, F.D., and Kaplan, D.R. Semaphorin 3F Antagonizes Neurotrophin-Induced Phosphatidylinositol 3-Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Signaling: A Mechanism for Growth Cone Collapse.
- Bai, G., and Pfaff, S.L. (2011). Protease regulation: the Yin and Yang of neural development and disease. *Neuron* *72*, 9–21.
- Bai, G., Chivatakarn, O., Bonanomi, D., Lettieri, K., Franco, L., Xia, C., Stein, E., Le Ma, Lewcock, J.W., and Pfaff, S.L. (2011). Presenilin-Dependent Receptor Processing Is Required for Axon Guidance. *Cell* *144*, 106–118.
- Banzai, Y., Miki, H., Yamaguchi, H., and Takenawa, T. (2000). Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in neurite extension in PC12 cells and rat hippocampal primary culture cells. *The Journal of Biological Chemistry* *275*, 11987–11992.
- Bard, L., Boscher, C., Lambert, M., Mège, R.-M., Choquet, D., and Thoumine, O. A Molecular Clutch between the Actin Flow and N-Cadherin Adhesions Drives Growth Cone Migration. [Jneurosci.org](http://jneurosci.org).
- Bashaw, G.J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., and Goodman, C.S. (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* *101*, 703–715.
- Bassell, G.J., Zhang, H., Byrd, A.L., Femino, A.M., Singer, R.H., Taneja, K.L., Lifshitz, L.M., Herman, I.M., and Kosik, K.S. Sorting of β -Actin mRNA and Protein to Neurites and Growth

Cones in Culture.

Bastian, P., Lang, K., Niggemann, B., Zaenker, K.S., and Entschladen, F. (2005). Myosin regulation in the migration of tumor cells and leukocytes within a three-dimensional collagen matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 65–76.

Beadle, C., Assanah, M.C., Monzo, P., Vallee, R., Rosenfeld, S.S., and Canoll, P. (2008). The Role of Myosin II in Glioma Invasion of the Brain. *Molecular Biology of the Cell* 19, 3357–3368.

Beel, A.J., and Sanders, C.R. (2008). Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 65, 1311–1334.

Behr, D., Elle, C., Underwood, J., Davis, J.B., Ward, R., Karran, E., Masters, C.L., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (1999). Proteolytic fragments of Alzheimer's disease-associated presenilin 1 are present in synaptic organelles and growth cone membranes of rat brain. *Journal of Neurochemistry* 72, 1564–1573.

Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horre, K., Wiltfang, J., Esselmann, H., and Strooper, B. (2006). Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *Journal of Neurochemistry* 96, 732–742.

Betapudi, V. (2006). Distinct Roles of Nonmuscle Myosin II Isoforms in the Regulation of MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Spreading and Migration. *Cancer Research* 66, 4725–4733.

Billuart, P., Winter, C.G., Maresh, A., Zhao, X., and Luo, L. (2001). Regulating axon branch stability: the role of p190 RhoGAP in repressing a retraction signaling pathway. *Cell* 107, 195–207.

Bokoch, G.M. (2003). BIOLOGY OF HEP21-ACTIVATED KINASES. *Annual Review of Biochemistry* 72, 743–781.

Borisoff, J.F., Chan, C.C.M., Hiebert, G.W., Oschipok, L., Robertson, G.S., Zamboni, R., Steeves, J.D., and Tetzlaff, W. (2003). Suppression of Rho-kinase activity promotes axonal growth on inhibitory CNS substrates. *Molecular and Cellular Neuroscience* 22, 405–416.

Bouvier, D., Corera, A.T., and Tremblay, M.É. (2008). Pre-synaptic and post-synaptic localization of EphA4 and EphB2 in adult mouse forebrain - Bouvier - 2008 - *Journal of Neurochemistry* - Wiley Online Library. *Journal of Neurochemistry*.

Bovolenta, P., and Feraud-Espinosa, I. (2000). Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Progress in Neurobiology* 61, 113–132.

Bradke, F. (1999). The Role of Local Actin Instability in Axon Formation. *Science (New York, NY)* 283, 1931–1934.

Brantley-Sieders, D.M. (2012). Clinical relevance of Ephs and ephrins in cancer: lessons from breast, colorectal, and lung cancer profiling. *23*, 102–108.

Bridgman, P.C., Dave, S., Asnes, C.F., Tullio, A.N., and Adelstein, R.S. Myosin IIB Is Required for Growth Cone Motility. *Jneurosci.org*.

Brouns, M.R., Matheson, S.F., and Settleman, J. (2001). p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nature Cell Biology* 3, 361–367.

Buchwald, G., Hostinova, E., Rudolph, M.G., Kraemer, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Scheffzek, K., and Wittinghofer, A. (2001). Conformational switch and role of phosphorylation in PAK activation. *Molecular and Cellular Biology* 21, 5179–5189.

- Busciglio, J., Hartmann, H., Lorenzo, A., Wong, C., Baumann, K., Sommer, B., Staufenbiel, M., and Yankner, B.A. Neuronal Localization of Presenilin-1 and Association with Amyloid Plaques and Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *J Neurosci.org*.
- Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., and Black, R.A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 27765–27767.
- Carmona, M.A., Murai, K.K., Wang, L., Roberts, A.J., and Pasquale, E.B. (2009). Glial ephrin-A3 regulates hippocampal dendritic spine morphology and glutamate transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 12524–12529.
- Carpenter, D.A., and Ip, W. (1996). Neurofilament triplet protein interactions: evidence for the preferred formation of NF-L-containing dimers and a putative function for the end domains. *Journal of Cell Science* 109, 2493–2498.
- Carvalho, R.F., Beutler, M., Marler, K.J.M., Knöll, B., Becker-Barroso, E., Heintzmann, R., Ng, T., and Drescher, U. (2006). Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nature Neuroscience* 9, 322–330.
- Chen, H., Chédotal, A., He, Z., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19, 547–559.
- Chevalier-Larsen, E., and Holzbaur, E.L.F. (2006). Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1762, 1094–1108.
- Cirulli, V., and Yebra, M. (2007). Netrins: beyond the brain. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 296–306.
- Citron, M., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1995). Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14, 661–670.
- Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 319–332.
- Condic, M.L., and Letourneau, P.C. (1997). Ligand-induced changes in integrin expression regulate neuronal adhesion and neurite outgrowth. *Nature* 389, 852–856.
- Cordy, J.M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N.M., and Turner, A.J. (2003). Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11735–11740.
- Cowan, C.W., Shao, Y.R., Sahin, M., Shamah, S.M., Lin, M.Z., Greer, P.L., Gao, S., Griffith, E.C., Brugge, J.S., and Greenberg, M.E. (2005). Vav Family GEFs Link Activated Ephs to Endocytosis and Axon Guidance. *Neuron* 46, 205–217.
- Da Silva, J.S., and Dotti, C.G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 694–704.
- Da Silva, J.S., Hasegawa, T., Miyagi, T., Dotti, C.G., and Abad-Rodriguez, J. (2005). Asymmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. *Nature Neuroscience* 8, 606–615.
- Da Silva, J.S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., and Dotti, C.G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin Ila-mediated control of actin stability.

The Journal of Cell Biology 162, 1267–1279.

Dalva, M.B., Takasu, M.A., Lin, M.Z., Shamah, S.M., Hu, L., Gale, N.W., and Greenberg, M.E. (2000). EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103, 945–956.

Dan, C., Kelly, A., Bernard, O., and Minden, A. (2001). Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 32115–32121.

Davalos, V., Dopeso, H., Velho, S., Ferreira, A.M., and Cirnes, L. (2006). Oncogene - High EPHB2 mutation rate in gastric but not endometrial tumors with microsatellite instability. *Oncogene*.

Davis, J.A., Naruse, S., Chen, H., Eckman, C., Younkin, S., Price, D.L., Borchelt, D.R., Sisodia, S.S., and Wong, P.C. (1998). An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos. *Neuron* 20, 603–609.

Davis, T.L., Walker, J.R., Loppnau, P., Butler-Cole, C., Allali-Hassani, A., and Dhe-Paganon, S. (2008). Autoregulation by the juxtamembrane region of the human ephrin receptor tyrosine kinase A3 (EphA3). *Structure (London, England : 1993)* 16, 873–884.

Davy, A., and Robbins, S.M. (2000). Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *The EMBO Journal* 19, 5396–5405.

Day, B.W., Stringer, B.W., Al-Ejeh, F., Ting, M.J., Wilson, J., Ensbey, K.S., Jamieson, P.R., Bruce, Z.C., Lim, Y.C., Offenhäuser, C., et al. (2013). EphA3 Maintains Tumorigenicity and Is a Therapeutic Target in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Cell* 23, 238–248.

de Strooper, B. (2007). Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Reports* 8, 141–146.

de Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., et al. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518–522.

de Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Figura, von, K., and van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387–390.

Debanne, D., Campanac, E., Bialowas, A., Carlier, E., and Alcaraz, G. *Axon Physiology*. Physrev.Physiology.org.

Dent, E.W., Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2011). The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3.

Dent, E.W., Gupton, S.L., and Gertler, F.B. *The Growth Cone Cytoskeleton in Axon Outgrowth and Guidance*. Cshperspectives.com.

Dickson, B.J. (2001). Rho GTPases in growth cone guidance. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 103–110.

Dickson, B.J., and Gilestro, G.F. (2006). Regulation of Commissural Axon Pathfinding by Slit and its Robo Receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, 651–675.

Donoviel, D.B., Hadjantonakis, A.K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P.S., and Bernstein, A. (1999). Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes & Development* 13, 2801–2810.

- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 8, 1454–1468.
- Dovey, H.F., John, V., Anderson, J.P., Chen, L.Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L.Y., Freedman, S.B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E.J., et al. (2001). Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *Journal of Neurochemistry* 76, 173–181.
- Dowjat, W.K., Wisniewski, T., Efthimiopoulos, S., and Wisniewski, H.M. (1999). Inhibition of neurite outgrowth by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. *Neuroscience Letters* 267, 141–144.
- Dulyaninova, N.G., House, R.P., Betapudi, V., and Bresnick, A.R. (2007). Myosin-IIA Heavy-Chain Phosphorylation Regulates the Motility of MDA-MB-231 Carcinoma Cells. *Molecular Biology of the Cell* 18, 3144–3155.
- Díaz-Rodríguez, E., Montero, J.C., Esparís-Ogando, A., Yuste, L., and Pandiella, A. (2002). Extracellular Signal-regulated Kinase Phosphorylates Tumor Necrosis Factor α -converting Enzyme at Threonine 735: A Potential Role in Regulated Shedding.
- Essmann, C.L., Martinez, E., Geiger, J.C., Zimmer, M., Traut, M.H., Stein, V., Klein, R., and Acker-Palmer, A. (2008). Serine phosphorylation of ephrinB2 regulates trafficking of synaptic AMPA receptors. *Nature Neuroscience* 11, 1035–1043.
- Fambrough, D., Pan, D., Rubin, G.M., and Goodman, C.S. (1996). The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 1133–1138.
- Fan, X., Labrador, J.P., Hing, H., and Bashaw, G.J. (2003). Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* 40, 113–127.
- Feng, R., Rampon, C., Tang, Y.P., Shrom, D., Jin, J., Kyin, M., Sopher, B., Miller, M.W., Ware, C.B., Martin, G.M., et al. (2001). Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 32, 911–926.
- Filosa, A., Paixão, S., Honsek, S.D., Carmona, M.A., Becker, L., Feddersen, B., Gaitanos, L., Rudhard, Y., Schoepfer, R., Klopstock, T., et al. (2009). Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nature Neuroscience* 12, 1285–1292.
- Flanagan, J.G., and Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annual Review of Neuroscience* 21, 309–345.
- Fournier, A.E., Takizawa, B.T., and Strittmatter, S.M. (2003). Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 23, 1416–1423.
- Fujioka, S., Masuda, K., Toguchi, M., Ohoka, Y., Sakai, T., Furuyama, T., and Inagaki, S. (2003). Neurotrophic effect of Semaphorin 4D in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 304–310.
- Galko, M.J. (2000). Function of an Axonal Chemoattractant Modulated by Metalloprotease Activity. *Science (New York, NY)* 289, 1365–1367.
- Gallo, G., and Letourneau, P.C. (2003). Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *Journal of Neurobiology* 58, 92–102.

Gao, P.P., Yue, Y., Cerretti, D.P., Dreyfus, C., and Zhou, R. (1999). Ephrin-dependent growth and pruning of hippocampal axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 4073–4077.

Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamberg, J.R., and Bradke, F. (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, 13117–13129.

Gauthier, L.R., and Robbins, S.M. (2003). Ephrin signaling: One raft to rule them all? One raft to sort them? One raft to spread their call and in signaling bind them? *Life Sciences* 74, 207–216.

Geisbrecht, B.V., Dowd, K.A., Barfield, R.W., Longo, P.A., and Leahy, D.J. (2003). Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 32561–32568.

Georgakopoulos, A., Litterst, C., Ghersi, E., Baki, L., Xu, C., Serban, G., and Robakis, N.K. (2006). Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling. *The EMBO Journal* 25, 1242–1252.

Georgakopoulos, A., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Shioi, J., Cui, W., Li, H.C., Schütte, M., Gordon, R., Holstein, G.R., Martinelli, G., et al. (1999). Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts. *Molecular Cell* 4, 893–902.

Goldberg, J.L., Espinosa, J.S., Xu, Y., Davidson, N., Kovacs, G.T.A., and Barres, B.A. (2002). Retinal Ganglion Cells Do Not Extend Axons by Default. *Cell* 33, 689–702.

Gomez, T.M., Robles, E., Poo, M., and Spitzer, N.C. (2001). Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science (New York, NY)* 291, 1983–1987.

Govek, E.-E., Newey, S.E., and van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & Development* 19, 1–49.

Grembecka, J., Cierpicki, T., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Kang, B.S., Bushweller, J.H., and Derewenda, Z.S. (2006). The binding of the PDZ tandem of syntenin to target proteins. *Biochemistry* 45, 3674–3683.

Grunwald, I.C., Korte, M., Adelman, G., Plueck, A., Kullander, K., Adams, R.H., Frotscher, M., Bonhoeffer, T., and Klein, R. (2004). Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nature Neuroscience* 7, 33–40.

Guan, M., Liu, L., Zhao, X., Wu, Q., Yu, B., Shao, Y., Yang, H., Fu, X., Wan, J., and Zhang, W. (2011). Copy number variations of EphA3 are associated with multiple types of hematologic malignancies. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 11, 50–53.

Guellmar, A., Rudolph, J., and Bolz, J. (2009). Structural alterations of spiny stellate cells in the somatosensory cortex in ephrin-A5-deficient mice. *The Journal of Comparative Neurology* 517, 645–654.

Guo, H. (2006). Disruption of EphA2 Receptor Tyrosine Kinase Leads to Increased Susceptibility to Carcinogenesis in Mouse Skin. *Cancer Research* 66, 7050–7058.

Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., and Logeat, F. (2004). Monoubiquitination and endocytosis direct -secretase cleavage of activated Notch receptor. *The Journal of Cell Biology* 166, 73–83.

Guzik, B.W., and Goldstein, L.S. (2004). Microtubule-dependent transport in neurons: steps

- towards an understanding of regulation, function and dysfunction. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 443–450.
- Haapasalo, A., and Kovacs, D.M. (2011). The many substrates of presenilin/ γ -secretase. *Journal of Alzheimer's Disease* 25, 3–28.
- Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L., and Dickson, B.J. (2002). Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* 416, 438–442.
- Hall, A., and Lalli, G. (2010). Rho and Ras GTPases in Axon Growth, Guidance, and Branching. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a001818–a001818.
- Handler, M., Yang, X., and Shen, J. (2000). Presenilin-1 regulates neuronal differentiation during neurogenesis. *Development (Cambridge, England)*.
- Hansen, S.M., Berezin, V., and Bock, E. (2008). Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 3809–3821.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Lena Illert, A., Figura, Von, K., et al. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for α -secretase activity in fibroblasts. *Human Molecular Genetics* 11, 2615–2624.
- Hattori, M., Osterfield, M., and Flanagan, J.G. (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science (New York, NY)* 289, 1360–1365.
- He, Y., Francis, F., Myers, K.A., Yu, W., Black, M.M., and Baas, P.W. Role of cytoplasmic dynein in the axonal transport of microtubules and neurofilaments. *Jcb.Rupress.org*.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 690–701.
- Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., and Selkoe, D.J. (2008). Proteomic profiling of γ -secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biology* 6, e257.
- Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., and Selkoe, D.J. (2009). Identification of β -secretase (BACE1) substrates using quantitative proteomics. *PLoS One* 4, e8477.
- Hengst, U., Deglincerti, A., Kim, H.J., Jeon, N.L., and Jaffrey, S.R. (2009). Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein. *Nature Cell Biology* 11, 1024–1030.
- Herath, N.I., Doecke, J., Spanevello, M.D., Leggett, B.A., and Boyd, A.W. (2009). Epigenetic silencing of EphA1 expression in colorectal cancer is correlated with poor survival. *British Journal of Cancer* 100, 1095–1102.
- Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Umans, L., Schrijvers, V., Checler, F., Vanderstichele, H., et al. (1999). Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11872–11877.
- Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L., and de Strooper, B. (2000). Total inactivation of γ -secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* 2, 461–462.
- Hébert, S.S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M.A., Müller, U., and

- de Strooper, B. (2006). Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Reports* 7, 739–745.
- Himanen, J.P., Yermekbayeva, L., Janes, P.W., Walker, J.R., Xu, K., Atapattu, L., Rajashankar, K.R., Mensinga, A., Lackmann, M., Nikolov, D.B., et al. (2010). Architecture of Eph receptor clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 10860–10865.
- Hinoue, T., Weisenberger, D.J., Pan, F., Campan, M., Kim, M., Young, J., Whitehall, V.L., Leggett, B.A., and Laird, P.W. (2009). Analysis of the association between CIMP and BRAF in colorectal cancer by DNA methylation profiling. *PLoS One* 4, e8357.
- Hirokawa, N., Glicksman, M.A., and Willard, M.B. (1984). Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology* 98, 1523–1536.
- Ho, H.-Y.H., Rohatgi, R., Lebensohn, A.M., Le Ma, Li, J., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. (2004). Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118, 203–216.
- Hock, B., Bohme, B., Karn, T., Yamamoto, T., Kaibuchi, K., Holtrich, U., Holland, S., Pawson, T., Rubsamen-Waigmann, H., and Strebhardt, K. (1998). PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 9779–9784.
- Hoffman, P.N., Cleveland, D.W., Griffin, J.W., Landes, P.W., Cowan, N.J., and Price, D.L. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Pnas.org*.
- Holtzman, D.M., Morris, J.C., and Goate, A.M. (2011). Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine* 3, 77sr1–77sr1.
- Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97, 927–941.
- Hsouna, A., Kim, Y.-S., and VanBerkum, M.F.A. (2003). Abelson tyrosine kinase is required to transduce midline repulsive cues. *Journal of Neurobiology* 57, 15–30.
- Huot, J. (2004). Ephrin signaling in axon guidance. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28, 813–818.
- Huusko, P., Ponciano-Jackson, D., Wolf, M., Kiefer, J.A., Azorsa, D.O., Tuzmen, S., Weaver, D., Robbins, C., Moses, T., Allinen, M., et al. (2004). Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer. *Nature Genetics* 36, 979–983.
- Huynh-Do, U., Stein, E., Lane, A.A., Liu, H., Cerretti, D.P., and Daniel, T.O. (1999). Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through α 5 β 1 and α 3 β 1 integrins. *The EMBO Journal* 18, 2165–2173.
- Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Togawa, A., Matsui, C., Arita, K., Katahira-Tayama, S., Sato, T., Yamauchi, E., Oda, Y., and Takai, Y. (2009). Synaptic activity prompts -secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation. *The Journal of Cell Biology* 185, 551–564.
- Ito, K., Okamoto, I., Araki, N., Kawano, Y., Nakao, M., Fujiyama, S., Tomita, K., Mimori, T., and Saya, H. (1999). Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. *Oncogene* 18, 7080–7090.

- Janes, P.W., Saha, N., Barton, W.A., Kolev, M.V., Wimmer-Kleikamp, S.H., Nievergall, E., Blobel, C.P., Himanen, J.-P., Lackmann, M., and Nikolov, D.B. (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* *123*, 291–304.
- Jeon, C.Y., Kim, H.J., Lee, J.Y., Kim, J.B., Kim, S.C., and Park, J.B. (2010). p190RhoGAP and Rap-dependent RhoGAP (ARAP3) inactivate RhoA in response to nerve growth factor leading to neurite outgrowth from PC12 cells. *Experimental & Molecular Medicine* *42*, 335–344.
- Jiang, H., Guo, W., Liang, X., and Rao, Y. (2005). Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell* *120*, 123–135.
- Jin, K., Mao, X.O., and Greenberg, D.A. (2006). Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling. *Journal of Neurobiology* *66*, 236–242.
- Jin, Z., and Strittmatter, S.M. Rac1 Mediates Collapsin-1-Induced Growth Cone Collapse. Jneurosci.org.
- Kallhoff-Munoz, V., Hu, L., Chen, X., Pautler, R.G., and Zheng, H. Genetic Dissection of γ -Secretase-Dependent and-Independent Functions of Presenilin in Regulating Neuronal Cell Cycle and Cell Death. Jneurosci.org.
- Kaneko-Kawano, T., Takasu, F., Naoki, H., Sakumura, Y., Ishii, S., Ueba, T., Eiyama, A., Okada, A., Kawano, Y., and Suzuki, K. (2012). Dynamic Regulation of Myosin Light Chain Phosphorylation by Rho-kinase. *PloS One* *7*, e39269.
- Kärkkäinen, I., Rybnikova, E., Peltö-Huikko, M., and Huovila, A.P. (2000). Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Molecular and Cellular Neurosciences* *15*, 547–560.
- Kim, J., Kleizen, B., Choy, R., Thinakaran, G., Sisodia, S.S., and Schekman, R.W. (2007). Biogenesis of gamma-secretase early in the secretory pathway. *The Journal of Cell Biology* *179*, 951–963.
- Kim, W.-Y., Zhou, F.-Q., Zhou, J., Yokota, Y., Wang, Y.-M., Yoshimura, T., Kaibuchi, K., Woodgett, J.R., Anton, E.S., and Snider, W.D. (2006). Essential roles for GSK-3 α and GSK-3 β in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron* *52*, 981–996.
- Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Guénette, S.Y., and Selkoe, D.J. (2001). The Intracellular Domain of the β -Amyloid Precursor Protein Is Stabilized by Fe65 and Translocates to the Nucleus in a Notch-like Manner. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 10011–10017.
- Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C.M., Irizarry, M.C., and Hyman, B.T. (2003). Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *Journal of Cell Science* *116*, 3339–3346.
- Klein, R. (2001). Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Current Opinion in Cell Biology* *13*, 196–203.
- Klein, R. (2012). Eph/ephrin signalling during development. *Development (Cambridge, England)* *139*, 4105–4109.
- Ko, J., Yoon, C., Piccoli, G., Chung, H.S., Kim, K., Lee, J.-R., Lee, H.W., Kim, H., Sala, C., and Kim, E. (2006). Organization of the Presynaptic Active Zone by ERC2/CAST1-Dependent Clustering of the Tandem PDZ Protein Syntenin-1. *The Journal of Cell Biology* *174*, 101–112.

- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., and Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 5815–5820.
- Kolodkin, A.L., Levenson, D.V., Rowe, E.G., Tai, Y.-T., Giger, R.J., and Ginty, D.D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* *90*, 753–762.
- Koo, E.H., and Kopan, R. (2004). Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. *Nature Medicine* *10 Suppl*, S26–S33.
- Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2004). γ -secretase: proteasome of the membrane? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *5*, 499–504.
- Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* *137*, 216–233.
- Koppel, A.M., Feiner, L., Kobayashi, H., and Raper, J.A. (1997). A 70 Amino Acid Region within the Semaphorin Domain Activates Specific Cellular Response of Semaphorin Family Members. *Neuron* *19*, 531–537.
- Kovacs, D.M., Fausett, H.J., Page, K.J., Kim, T.W., Moir, R.D., Merriam, D.E., Hollister, R.D., Hallmark, O.G., Mancini, R., Felsenstein, K.M., et al. (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature Medicine* *2*, 224–229.
- Kramer, E.R., Knott, L., Su, F., Dessaud, E., Krull, C.E., Helmbacher, F., and Klein, R. (2006). Cooperation between GDNF/Ret and ephrinA/EphA4 Signals for Motor-Axon Pathway Selection in the Limb. *Neuron* *50*, 35–47.
- Kranenburg, O., Poland, M., van Horck, F.P., Drechsel, D., Hall, A., and Moolenaar, W.H. (1999). Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Molecular Biology of the Cell* *10*, 1851–1857.
- Kruger, R.P., Aurandt, J., and Guan, K.-L. (2005). Semaphorins command cells to move. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *6*, 789–800.
- Kudo, C., Ajioka, I., Hirata, Y., and Nakajima, K. (2005). Expression profiles of EphA3 at both the RNA and protein level in the developing mammalian forebrain. *Development* *132*, 255–269.
- Kuhn, P.-H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Rossner, S., and Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO Journal* *29*, 3020–3032.
- Kumar, S.R., Scehnet, J.S., Ley, E.J., Singh, J., Krasnoperov, V., Liu, R., Manchanda, P.K., Ladner, R.D., Hawes, D., Weaver, F.A., et al. (2009). Preferential induction of EphB4 over EphB2 and its implication in colorectal cancer progression. *Cancer Research* *69*, 3736–3745.
- Labelle, C., and Leclerc, N. (2000). Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Brain Research. Developmental Brain Research* *123*, 1–11.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., and Klein, W.L. (2007). A β Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*.
- Lai, C., and Feng, L. (2004). Implication of gamma-secretase in neuregulin-induced

maturation of oligodendrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314, 535–542.

Lai, M.-T., Chen, E., Crouthamel, M.-C., DiMuzio-Mower, J., Xu, M., Huang, Q., Price, E., Register, R.B., Shi, X.-P., Donoviel, D.B., et al. (2003). Presenilin-1 and presenilin-2 exhibit distinct yet overlapping gamma-secretase activities. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 22475–22481.

Lalonde, R., Qian, S., and Strazielle, C. (2003). Transgenic mice expressing the PS1-A246E mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination. *Behavioural Brain Research* 138, 71–79.

Lammich, S., Okochi, M., Takeda, M., Kaether, C., Capell, A., Zimmer, A.-K., Edbauer, D., Walter, J., Steiner, H., and Haass, C. Presenilin-dependent Intramembrane Proteolysis of CD44 Leads to the Liberation of Its Intracellular Domain and the Secretion of an A β -like Peptide. *Jbc.org*.

Laudon, H., Hansson, E.M., Melén, K., Bergman, A., Farmery, M.R., Winblad, B., Lendahl, U., Heijne, von, G., and Näslund, J. (2005). A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 35352–35360.

Lawrenson, I.D., Wimmer-Kleikamp, S.H., Lock, P., Schoenwaelder, S.M., Down, M., Boyd, A.W., Alewood, P.F., and Lackmann, M. (2002). Ephrin-A5 induces rounding, blebbing and de-adhesion of EphA3-expressing 293T and melanoma cells by CrkII and Rho-mediated signalling. *Journal of Cell Science* 115, 1059–1072.

Lazarov, V.K., Fraering, P.C., Ye, W., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J., and Li, H. (2006). Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6889–6894.

Lee, M.K., and Cleveland, D.W. (1994). Neurofilament function and dysfunction: involvement in axonal growth and neuronal disease. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 34–40.

Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D.G. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585–595.

Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D., Oshima, J., Pettingell, W., Yu, C., Jondro, P., Schmidt, S., Wang, K., et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (New York, NY)* 269, 973–977.

Lewis, A.K., and Bridgman, P.C. (1996). Mammalian myosin I α is concentrated near the plasma membrane in nerve growth cones - Lewis - 1998 - *Cell Motility and the Cytoskeleton* - Wiley Online Library. *Cell Motility and the Cytoskeleton*.

Li, J., Xu, M., Zhou, H., Ma, J., and Potter, H. (1997). Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. *Cell* 90, 917–927.

Li, J.-J., Liu, D.-P., Liu, G.-T., and Xie, D. (2009). EphrinA5 acts as a tumor suppressor in glioma by negative regulation of epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 28, 1759–1768.

Li, S., Leshchyn'ska, I., Chernyshova, Y., Schachner, M., and Sytnyk, V. The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Associates with and Signals through p21-Activated Kinase 1 (Pak1). *Jneurosci.org*.

Li, X. (2002). The Adaptor Protein Nck-1 Couples the Netrin-1 Receptor DCC (Deleted in Colorectal Cancer) to the Activation of the Small GTPase Rac1 through an Atypical Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 37788–37797.

Lim, Y.-S., McLaughlin, T., Sung, T.-C., Santiago, A., Lee, K.-F., and O'Leary, D.D.M. (2008). p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* *59*, 746–758.

Lin, C.H., and Forscher, P. (1995). Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron* *14*, 763–771.

Lisabeth, E.M., Fernandez, C., and Pasquale, E.B. (2012). Cancer Somatic Mutations Disrupt Functions of the EphA3 Receptor Tyrosine Kinase through Multiple Mechanisms. *Biochemistry* *51*, 1464–1475.

Litterst, C., Georgakopoulos, A., Shioi, J., Gherzi, E., Wisniewski, T., Wang, R., Ludwig, A., and Robakis, N.K. (2007). Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor. *The Journal of Biological Chemistry* *282*, 16155–16163.

Liu, B.P., and Strittmatter, S.M. (2001). Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Cell* *13*, 619–626.

Lleo, A., and A Saura, C. (2011). -Secretase Substrates and their Implications for Drug Development in Alzheimers Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*.

Louvi, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews Neuroscience* *7*, 93–102.

Louvi, A., Louvi, A., Sisodia, S.S., Sisodia, S.S., Grove, E.A., and Grove, E.A. (2004). Presenilin 1 in migration and morphogenesis in the central nervous system. *Development (Cambridge, England)* *131*, 3093–3105.

Lowery, L.A., and Vactor, D.V. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *10*, 332–343.

Lu, Q., Sun, E.E., Klein, R.S., and Flanagan, J.G. (2001). Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* *105*, 69–79.

Lundquist, E.A., Reddien, P.W., Hartweg, E., Horvitz, H.R., and Bargmann, C.I. (2001). Three *C. elegans* Rac proteins and several alternative Rac regulators control axon guidance, cell migration and apoptotic cell phagocytosis. *Development (Cambridge, England)* *128*, 4475–4488.

Luo, L. (2002). A CTINC YOSKELETONR EGULATION INN EURONALM ORPHOGENESIS ANDS TRUCTURALP LASTICITY. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *18*, 601–635.

Luo, L., Hensch, T.K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* *379*, 837–840.

Maeda, J., Hirano, T., Ogiwara, A., Akimoto, S., Kawakami, T., Fukui, Y., Oka, T., Gong, Y., Guo, R., Inada, H., et al. (2008). Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualisation of postoperative therapy. *British Journal of Cancer* *98*, 596–603.

Maekawa, M. (1999). Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science (New York, NY)* *285*, 895–898.

Marambaud, P., Wen, P.H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., and Robakis, N.K. (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/ε-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* *114*, 635–645.

- Marcello, E., Gardoni, F., Mauceri, D., Romorini, S., Jeromin, A., Epis, R., Borroni, B., Cattabeni, F., Sala, C., Padovani, A., et al. (2007). Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, 1682–1691.
- Marler, K.J.M., Becker-Barroso, E., Martínez, A., Llovera, M., Wentzel, C., Poopalasundaram, S., Hindges, R., Soriano, E., Comella, J., and Drescher, U. (2008). A TrkB/EphrinA Interaction Controls Retinal Axon Branching and Synaptogenesis. *The Journal of \Ldots*.
- Marquardt, T., Shirasaki, R., Ghosh, S., Andrews, S.E., Carter, N., Hunter, T., and Pfaff, S.L. (2005). Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains. *Cell* 121, 127–139.
- McClelland, A.C., Hruska, M., Coenen, A.J., Henkemeyer, M., and Dalva, M.B. (2010). Trans-synaptic EphB2--ephrin--B3 interaction regulates excitatory synapse density by inhibition of postsynaptic MAPK signaling. *Proceedings of the \Ldots*.
- MCLENDON, C., XIN, T., ZIANI-CHERIF, C., MURPHY, M.P., FINDLAY, K.A., LEWIS, P.A., PINNIX, I., SAMBAMURTI, K., Wang, R., FAUQ, A., et al. (2000). Cell-free assays for γ -secretase activity.
- Medeiros, N.A., Burnette, D.T., and Forscher, P. (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nature Cell Biology* 8, 216–226.
- Miao, H., Wei, B.R., Peehl, D.M., Li, Q., Alexandrou, T., Schelling, J.R., Rhim, J.S., Sedor, J.R., Burnett, E., and Wang, B. (2001). Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nature Cell Biology* 3, 527–530.
- Migani, P., Bartlett, C., Dunlop, S., Beazley, L., and Rodger, J. (2009). Regional and cellular distribution of ephrin-B1 in adult mouse brain. *Brain Research* 1247, 50–61.
- Moore, S.W., Correia, J.P., Sun, K.L.W., Pool, M., Fournier, A.E., and Kennedy, T.E. Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1. *Dev.Biologists.org*.
- Morohashi, Y., Kan, T., Tominari, Y., Fuwa, H., Okamura, Y., Watanabe, N., Sato, C., Natsugari, H., Fukuyama, T., Iwatsubo, T., et al. (2006). C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic gamma-secretase-specific inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). *The Journal of Biological Chemistry* 281, 14670–14676.
- Mueller, B.K. (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annual Review of Neuroscience* 22, 351–388.
- Murai, K.K., and Pasquale, E.B. (2005). New exchanges in eph-dependent growth cone dynamics. *Neuron* 46, 161–163.
- Müller-Tidow, C., Diederichs, S., Bulk, E., Pohle, T., Steffen, B., Schwäble, J., Plewka, S., Thomas, M., Metzger, R., Schneider, P.M., et al. (2005). Identification of Metastasis-Associated Receptor Tyrosine Kinases in Non--Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*.
- Myers, K.A., Tint, I., Nadar, C.V., He, Y., Black, M.M., and Baas, P.W. (2006). Antagonistic forces generated by cytoplasmic dynein and myosin-II during growth cone turning and axonal retraction. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7, 1333–1351.
- Naresh, A. (2006). The ERBB4/HER4 Intracellular Domain 4ICD Is a BH3-Only Protein Promoting Apoptosis of Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 66, 6412–6420.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B.J., and

- Luo, L. (2002). Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* 416, 442–447.
- Nishikimi, M., Oishi, K., Tabata, H., Torii, K., and Nakajima, K. (2011). Segregation and pathfinding of callosal axons through EphA3 signaling. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31, 16251–16260.
- Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y.-I., Ohno, S., Hoshino, M., and Kaibuchi, K. (2005). PAR-6--PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nature Cell Biology* 7, 270–277.
- Noren, N.K., and Pasquale, E.B. (2004). Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. *Cellular Signalling* 16, 655–666.
- North, H.A., Zhao, X., Kolk, S.M., Clifford, M.A., Ziskind, D.M., and Donoghue, M.J. (2009). Promotion of proliferation in the developing cerebral cortex by EphA4 forward signaling. *Development (Cambridge, England)* 136, 2467–2476.
- O'Donnell, M., Chance, R.K., and Bashaw, G.J. (2009). Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. *Annual Review of Neuroscience* 32, 383–412.
- Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. R-Ras Controls Axon Specification Upstream of Glycogen Synthase Kinase-3 β through Integrin-linked Kinase. *Jbc.org*.
- Oliva, A.A., Atkins, C.M., Copenagle, L., and Banker, G.A. Activated c-Jun N-Terminal Kinase Is Required for Axon Formation. *Jneurosci.org*.
- Otal, R., Burgaya, F., Frisén, J., Soriano, E., and Martínez, A. (2006). Ephrin-A5 modulates the topographic mapping and connectivity of commissural axons in murine hippocampus. *Neuroscience* 141, 109–121.
- Parent, A.T., Barnes, N.Y., Taniguchi, Y., Thinakaran, G., and Sisodia, S.S. (2005). Presenilin attenuates receptor-mediated signaling and synaptic function. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 25, 1540–1549.
- Pasquale, E.B. (1997). The Eph family of receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 608–615.
- Pasquale, E.B. (2004). Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. *Nature Neuroscience* 7, 417–418.
- Pasquale, E.B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 462–475.
- Pigino, G., Pelsman, A., Mori, H., and Busciglio, J. (2001). Presenilin-1 mutations reduce cytoskeletal association, deregulate neurite growth, and potentiate neuronal dystrophy and tau phosphorylation. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 21, 834–842.
- Poirier, J., Bertrand, P., Poirier, J., Kogan, S., Gauthier, S., Poirier, J., Gauthier, S., Davignon, J., Bouthillier, D., and Davignon, J. (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *The Lancet* 342, 697–699.
- Polavarapu, R., An, J., Zhang, C., and Yepes, M. (2008). Regulated intramembrane proteolysis of the low-density lipoprotein receptor-related protein mediates ischemic cell death. *The American Journal of Pathology* 172, 1355–1362.
- Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P.A. (2003). CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 33–45.

- Prasad, B.C., and Clark, S.G. (2006). Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in *C. elegans*. *Development (Cambridge, England)* *133*, 1757–1766.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* *362*, 329–344.
- Raulo, E., Chernousov, M.A., Carey, D.J., Nolo, R., and Rauvala, H. Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *Jbc.org*.
- Ray, W.J., Yao, M., Nowotny, P., Mumm, J., Zhang, W., Wu, J.Y., Kopan, R., and Goate, A.M. (1999). Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 3263–3268.
- Restituto, S., Khatri, L., Ninan, I., Mathews, P.M., Liu, X., Weinberg, R.J., and Ziff, E.B. Synaptic Autoregulation by Metalloproteases and γ -Secretase. *Jneurosci.org*.
- Riehl, R., Johnson, K., Bradley, R., Grunwald, G.B., Cornel, E., Lilienbaum, A., and Holt, C.E. (1996). Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* *17*, 837–848.
- Riento, K., and Ridley, A.J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Cell Biology* *4*, 446–456.
- Rocher-Ros, V., Marco, S., Mao, J., Gines, S., and Metzger, D. (2010). Presenilin modulates EGFR signaling and cell transformation by regulating the ubiquitin ligase Fbw7. *Oncogene*.
- Rodenas-Ruano, A., Perez-Pinzon, M.A., Green, E.J., Henkemeyer, M., and Liebl, D.J. (2006). Distinct roles for ephrinB3 in the formation and function of hippocampal synapses. *Developmental Biology* *292*, 34–45.
- Roth, S., Bisbal, M., Brocard, J., Bugnicourt, G., Saoudi, Y., Andrieux, A., Gory-Fauré, S., and Villard, C. (2012). How Morphological Constraints Affect Axonal Polarity in Mouse Neurons. *PLoS One* *7*, e33623.
- Rotz, von, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., and Konietzko, U. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *Journal of Cell Science* *117*, 4435–4448.
- Sahin, M., Greer, P.L., Lin, M.Z., Poucher, H., Eberhart, J., Schmidt, S., Wright, T.M., Shamah, S.M., O'connell, S., Cowan, C.W., et al. (2005). Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron* *46*, 191–204.
- Sanders, L.C. (1999). Inhibition of Myosin Light Chain Kinase by p21-Activated Kinase. *Science (New York, NY)* *283*, 2083–2085.
- Sastre, M. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Reports* *2*, 835–841.
- Sato, T., Diehl, T.S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., de Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., and Wolfe, M.S. (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *The Journal of Biological Chemistry* *282*, 33985–33993.
- Saura, C.A. (2000). The Nonconserved Hydrophilic Loop Domain of Presenilin (PS) Is Not Required for PS Endoproteolysis or Enhanced Abeta 42 Production Mediated by Familial Early Onset Alzheimer's Disease-linked PS Variants. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 17136–17142.

- Saura, C.A., Choi, S.-Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., Kelleher, R.J., Kandel, E.R., Duff, K., et al. (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* *42*, 23–36.
- Saura, C.A., Servián-Morilla, E., and Scholl, F.G. (2011). PLOS ONE: Presenilin/γ-Secretase Regulates Neurexin Processing at Synapses. *PloS One*.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & Development* *16*, 1587–1609.
- Schroeter, E.H. (2003). A presenilin dimer at the core of the -secretase enzyme: Insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 13075–13080.
- Schwamborn, J.C., and Püschel, A.W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nature Neuroscience* *7*, 923–929.
- Schwartz, J.H. (1979). Axonal transport: components, mechanisms, and specificity. *Annual Review of Neuroscience* *2*, 467–504.
- Segura, I., Essmann, C.L., Weinges, S., and Acker-Palmer, A. (2007). Grb4 and GIT1 transduce ephrinB reverse signals modulating spine morphogenesis and synapse formation. *Nature Neuroscience* *10*, 301–310.
- Selkoe, D., and Kopan, R. (2003). N OTCH ANDP RESENILIN: Regulated Intramembrane Proteolysis Links Development and Degeneration. *Annual Review of Neuroscience* *26*, 565–597.
- Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science (New York, NY)* *298*, 789–791.
- Sentürk, A., Pfennig, S., Weiss, A., Burk, K., and Acker-Palmer, A. (2011). Ephrin Bs are essential components of the Reelin pathway to regulate neuronal migration. *Nature* *472*, 356–360.
- Shamah, S.M., Lin, M.Z., Goldberg, J.L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R.L., Corfas, G., Debant, A., et al. (2001). EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* *105*, 233–244.
- Shekarabi, M., Moore, S.W., Tritsch, N.X., Morris, S.J., Bouchard, J.-F., and Kennedy, T.E. Deleted in Colorectal Cancer Binding Netrin-1 Mediates Cell Substrate Adhesion and Recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an Intracellular Signaling Complex That Promotes Growth Cone Expansion.
- Shen, J., and Kelleher, R.J. (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 403–409.
- Shen, J., Bronson, R.T., Chen, D.F., Xia, W., Selkoe, D.J., and Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* *89*, 629–639.
- Sherr, E.H., Joyce, M.P., and Greene, L.A. (1993). Mammalian myosin I alpha, I beta, and I gamma: new widely expressed genes of the myosin I family. *The Journal of Cell Biology*.
- Sherrington, R., Froelich, S., Sorbi, S., Campion, D., Chi, H., Rogaeve, E.A., Levesque, G., Rogaeve, E.I., Lin, C., Liang, Y., et al. (1996). Alzheimer's Disease Associated with Mutations in Presenilin 2 is Rare and Variably Penetrant.

- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., and Holman, K. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* *375*, 754–760.
- Shi, S.-H., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* *112*, 63–75.
- Shirotani, K., Edbauer, D., and Kostka, M. (2004). Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1 - Shirotani - 2004 - *Journal of Neurochemistry* - Wiley Online Library. *Journal of \Ldots*.
- Shirotani, K., Edbauer, D., Capell, A., Schmitz, J., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Gamma-secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. *The Journal of Biological Chemistry* *278*, 16474–16477.
- Simón, A.M., de Maturana, R.L., Ricobaraza, A., Escribano, L., Schiapparelli, L., Cuadrado-Tejedor, M., Pérez-Mediavilla, A., Avila, J., Del Río, J., and Frechilla, D. (2009). Early changes in hippocampal Eph receptors precede the onset of memory decline in mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* *17*, 773–786.
- Song, S., Rosen, K.M., and Corfas, G. (2013). Biological Function of Nuclear Receptor Tyrosine Kinase Action. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *5*, a009001–a009001.
- Song, W. (1999). Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 6959–6963.
- Soriano, S., Kang, D.E., Fu, M., Pestell, R., Chevallier, N., Zheng, H., and Koo, E.H. (2001). Presenilin 1 negatively regulates beta-catenin/T cell factor/lymphoid enhancer factor-1 signaling independently of beta-amyloid precursor protein and notch processing. *The Journal of Cell Biology* *152*, 785–794.
- Spitzer, N.C. (2002). Activity-dependent neuronal differentiation prior to synapse formation: the functions of calcium transients. *Journal of Physiology-Paris* *96*, 73–80.
- Steward, O., and Schuman, E.M. (2003). Compartmentalized Synthesis and Degradation of Proteins in Neurons. *Cell* *40*, 347–359.
- Suter, D.M., Errante, L.D., Belotserkovsky, V., and Forscher, P. (1998). The Ig superfamily cell adhesion molecule, apCAM, mediates growth cone steering by substrate-cytoskeletal coupling. *The Journal of Cell Biology* *141*, 227–240.
- Tang, N., and Ostap, E.M. (2001). Motor domain-dependent localization of myo1b (myr-1). *Current Biology* *11*, 1131–1135.
- Tanzi, R.E., and Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* *120*, 545–555.
- Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., et al. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* *17*, 181–190.
- Threadgill, R., Bobb, K., and Ghosh, A. (1997). Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* *19*, 625–634.
- Tomita, T., Tanaka, S., Morohashi, Y., and Iwatsubo, T. (2006). Presenilin-dependent intramembrane cleavage of ephrin-B1. *Molecular Neurodegeneration* *1*, 2.

- Tong, J., Killeen, M., Steven, R., Binns, K.L., Culotti, J., and Pawson, T. (2001). Netrin stimulates tyrosine phosphorylation of the UNC-5 family of netrin receptors and induces Shp2 binding to the RCM cytodomain. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 40917–40925.
- TORRES, R. (1998). PDZ Proteins Bind, Cluster, and Synaptically Colocalize with Eph Receptors and Their Ephrin Ligands. *Neuron* 21, 1453–1463.
- Tournoy, J., Bossuyt, X., Snellinx, A., Regent, M., Garmyn, M., Serneels, L., Saftig, P., Craessaerts, K., de Strooper, B., and Hartmann, D. (2004). Partial loss of presenilins causes seborrhic keratosis and autoimmune disease in mice. *Human Molecular Genetics* 13, 1321–1331.
- Tucker, K.L., Meyer, M., and Barde, Y.-A. (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nature Neuroscience* 4, 29–37.
- Turpin, F.R., Potier, B., Dulong, J.R., Sinet, P.M., Alliot, J., Olier, S.H.R., Dutar, P., Epelbaum, J., Mothet, J.P., and Billard, J.M. (2011). Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function. *Neurobiology of Aging* 32, 1495–1504.
- Urra, S., Escudero, C.A., Ramos, P., Lisbona, F., Allende, E., Covarrubias, P., Parraguez, J.I., Zampieri, N., Chao, M.V., Annaert, W., et al. (2007). TrkA Receptor Activation by Nerve Growth Factor Induces Shedding of the p75 Neurotrophin Receptor Followed by Endosomal γ -Secretase-mediated Release of the p75 Intracellular Domain. *Journal of Biological Chemistry* 282, 1025–1033.
- Vallee, R.B., Seale, G.E., and Tsai, J.-W. (2009). Emerging roles for myosin II and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones. *Trends in Cell Biology* 19, 347–355.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Cytoskeletal motors: Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. 1–13.
- Vidal, G.A., Naresh, A., Marrero, L., and Jones, F.E. (2005). Presenilin-dependent γ -Secretase Processing Regulates Multiple ERBB4/HER4 Activities. *Journal of Biological Chemistry* 280, 1025–1033.
- Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K., and Mueller, B.K. (2000). Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *The Journal of Cell Biology* 149, 263–270.
- Wang, R., Dineley, K.T., Sweatt, J.D., and Zheng, H. (2004). Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning and impaired adult neurogenesis. *Neuroscience* 126, 305–312.
- Wang, S., Watanabe, T., Noritake, J., Fukata, M., Yoshimura, T., Itoh, N., Harada, T., Nakagawa, M., Matsuura, Y., Arimura, N., et al. (2007). IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *Journal of Cell Science* 120, 567–577.
- Watabe-Uchida, M., John, K.A., Janas, J.A., Newey, S.E., and van Aelst, L. (2006). The Rac Activator DOCK7 Regulates Neuronal Polarity through Local Phosphorylation of Stathmin/Op18. *Neuron* 51, 727–739.
- Waxman, S.G., Kocsis, J.D., and Stys, P.K. (1995). *The Axon: Structure, Function, and Pathophysiology* - Google Books.
- Webber, C.A., Hocking, J.C., Yong, V.W., Stange, C.L., and McFarlane, S. (2002). Metalloproteases and guidance of retinal axons in the developing visual system. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, 8091–8100.
- Wegmeyer, H., Egea, J., Rabe, N., Gezelius, H., Filosa, A., Enjin, A., Varoqueaux, F.,

- Deiningner, K., Schnütgen, F., Brose, N., et al. (2007). EphA4-dependent axon guidance is mediated by the RacGAP alpha2-chimaerin. *Neuron* 55, 756–767.
- Weijzen, S., Rizzo, P., Braid, M., Vaishnav, R., Jonkheer, S.M., Zlobin, A., Osborne, B.A., Gottipati, S., Aster, J.C., Hahn, W.C., et al. (2002). Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nature Medicine* 8, 979–986.
- Wen, P.H., De Gasperi, R., Gama Sosa, M.A., and Elder, G.A. (2004). Neural progenitor cells do not differentiate prematurely in presenilin-1 null mutant mice. *Neuroscience Letters* 371, 249–254.
- Wiggin, G.R., Fawcett, J.P., and Pawson, T. (2005). Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis. *Developmental Cell* 8, 803–816.
- Wiley, J.C., Hudson, M., Kanning, K.C., Schecterson, L.C., and Bothwell, M. (2005). Familial Alzheimer's disease mutations inhibit gamma-secretase-mediated liberation of beta-amyloid precursor protein carboxy-terminal fragment. *Journal of Neurochemistry* 94, 1189–1201.
- Wilkinson, D.G. (2001). Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 155–164.
- Williams, E.J., Furness, J., Walsh, F.S., and Doherty, P. (1994). Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13, 583–594.
- Wills, Z., Marr, L., Zinn, K., Goodman, C.S., and Van Vactor, D. (1999). Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo. *Neuron* 22, 291–299.
- Wimmer-Kleikamp, S.H. (2004). Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact. *The Journal of Cell Biology* 164, 661–666.
- Wolfe, M.S. (2001). Presenilin and gamma-secretase: structure meets function. *Journal of Neurochemistry* 76, 1615–1620.
- Wolfe, M.S., Selkoe, D.J., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., and Kimberly, W.T. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* 398, 513–517.
- Wong, P.C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M.W., Sirinathsinghji, D.J., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Price, D.L., Van der Ploeg, L.H., and Sisodia, S.S. (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387, 288–292.
- Wybenga-Groot, L.E., Baskin, B., Ong, S.H., Tong, J., Pawson, T., and Sicheri, F. (2001). Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell* 106, 745–757.
- Wykosky, J., and Debinski, W. (2008). The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Molecular Cancer Research : MCR* 6, 1795–1806.
- Wylie, S.R. (2003). Myosin IIA Drives Neurite Retraction. *Molecular Biology of the Cell* 14, 4654–4666.
- Xi, H.-Q., Wu, X.-S., Wei, B., and Chen, L. (2012). Aberrant expression of EphA3 in gastric carcinoma: correlation with tumor angiogenesis and survival. *Journal of Gastroenterology* 47, 785–794.
- Xia, X., Qian, S., Soriano, S., Wu, Y., Fletcher, A.M., Wang, X.J., Koo, E.H., Wu, X., and Zheng, H. (2001). Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and

skin tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10863–10868.

Xia, X., Wang, P., Sun, X., Soriano, S., Shum, W.-K., Yamaguchi, H., Trumbauer, M.E., Takashima, A., Koo, E.H., and Zheng, H. The aspartate-257 of presenilin 1 is indispensable for mouse development and production of β -amyloid peptides through β -catenin-independent mechanisms.

Xu, N.-J., and Henkemeyer, M. (2009). Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nature Neuroscience* **12**, 268–276.

Yamada, K.M., Spooner, B.S., and Wessells, N.K. ULTRASTRUCTURE AND FUNCTION OF GROWTH CONES AND AXONS OF CULTURED NERVE CELLS. *Jcb.Rupress.org*.

Yan, D., Guo, L., and Wang, Y. (2006). Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquitin-proteasome system for neuronal polarity. *The Journal of Cell Biology* **174**, 415–424.

Yoon, K., and Gaiano, N. (2005). Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nature Neuroscience* **8**, 709–715.

Yuan, A., Rao, M.V., Sasaki, T., Chen, Y., Kumar, A., Veeranna, Liem, R.K.H., Eyer, J., Peterson, A.C., Julien, J.-P., et al. (2006). α -Internexin Is Structurally and Functionally Associated with the Neurofilament Triplet Proteins in the Mature CNS. *The Journal of \Ldots*.

Yue, Y., Chen, Z.-Y., Gale, N.W., Blair-Flynn, J., Hu, T.-J., Yue, X., Cooper, M., Crockett, D.P., Yancopoulos, G.D., Tessarollo, L., et al. (2002). Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10777–10782.

Yurchenco, P.D., and Wadsworth, W.G. (2004). Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 572–579.

Zhang, H., Sun, S., Herreman, A., de Strooper, B., and Bezprozvanny, I. (2010). Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* **30**, 8566–8580.

Zhang, Y.-W., Wang, R., Liu, Q., Zhang, H., Liao, F.-F., and Xu, H. (2007). Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10613–10618.

Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., and Yankner, B.A. (2000). Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nature Cell Biology* **2**, 463–465.

Zhao, L., Ma, Q.-L., Calon, F., Harris-White, M.E., Yang, F., Lim, G.P., Morihara, T., Ubeda, O.J., Ambegaokar, S., Hansen, J.E., et al. (2006). Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease. *Nature Neuroscience* **9**, 234–242.

Zhuang, G., Brantley-Sieders, D.M., Vaught, D., Yu, J., Xie, L., Wells, S., Jackson, D., Muraoka-Cook, R., Arteaga, C., and Chen, J. (2010a). Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Research* **70**, 299–308.

Zhuang, G., Song, W., Amato, K., Hwang, Y., Lee, K., Boothby, M., Ye, F., Guo, Y., Shyr, Y., Lin, L., et al. (2012). Effects of Cancer-Associated EPHA3 Mutations on Lung Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **104**, 1183–1198.

Zhuang, Z., Yang, B., Theus, M.H., Sick, J.T., Bethea, J.R., Sick, T.J., and Liebl, D.J. (2010b). EphrinBs Regulate d-Serine Synthesis and Release in Astrocytes. \Ldots of

Neuroscience.

Zimmer, M., Palmer, A., Köhler, J., and Klein, R. (2003). EphB–ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nature Cell Biology* 5, 869–878.

Zimmerman, L., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Parr, B., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G., and McMahon, A. (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Cell* 12, 11–24.

Zisch, A.H., Pazzagli, C., Freeman, A.L., Schneller, M., Hadman, M., Smith, J.W., Ruoslahti, E., and Pasquale, E.B. (2000). Replacing two conserved tyrosines of the EphB2 receptor with glutamic acid prevents binding of SH2 domains without abrogating kinase activity and biological responses. *Oncogene* 19, 177–187.

Zogopoulos, G., Jørgensen, C., Bacani, J., Montpetit, A., Lepage, P., Ferretti, V., Chad, L., Selvarajah, S., Zanke, B., Hudson, T.J., et al. (2008). Germline EPHB2 receptor variants in familial colorectal cancer. *PloS One* 3, e2885.

Zou, J.X., Wang, B., Kalo, M.S., Zisch, A.H., Pasquale, E.B., and Ruoslahti, E. (1999). An Eph receptor regulates integrin activity through R-Ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13813–13818.

Zuo, J., Ferguson, T.A., Hernandez, Y.J., Stetler-Stevenson, W.G., and Muir, D. Neuronal Matrix Metalloproteinase-2 Degrades and Inactivates a Neurite-Inhibiting Chondroitin Sulfate Proteoglycan. *Jneurosci.org*.

Ephrin-B1 and ephrin-B2 mediate EphB-dependent presynaptic development via syntenin-1.