



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Paper de la Sintaxina-1 i els *lipid rafts* en guia axonal i regeneració neural

Cristina Roselló Busquets

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

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

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

PAPER DE
LA SINTAXINA-1
i els lipid
rafts **EN GUIA**
AXONAL I
REGENERACIÓ
NEURAL

Barcelona
— 2019

Cristina Roselló
Busquets



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA

Paper de la Sintaxina-1 i els *lipid rafts* en guia axonal i regeneració neural.

Memòria presentada per **Cristina Roselló Busquets**, llicenciada en Biologia, per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona.

Els estudis de tercer cicle s'han emmarcat dins del programa de Doctorat en Biomedicina de la Universitat de Barcelona. El projecte de Tesi Doctoral s'ha escrit al Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. El treball experimental i redacció de la memòria presentats han estat dirigits pels Drs. **Eduardo Soriano García** i **Ramón Martínez Mármol**.

Barcelona,

Vist i plau dels directors i tutor de la tesi:

Dr. Eduardo Soriano García

(Director i tutor)

Dr. Ramón Martínez Mármol

(Director)

La Candidata a Doctora,

Cristina Roselló Busquets

*Al meu trípode,
ells ja saben qui són.*

*“En la vida no existe nada que temer,
solo cosas que comprender.”*

(Marie Curie)

Agraiments

Sembla ser que el final d'una etapa s'aproxima. Més que un final m'agrada veure-ho com una bifurcació del camí. Un camí que mai sabem on acaba i poques vegades sabem on ens porta. El que sí que sabem és el que hem recorregut i tota la gent que ens ha acompanyat, i molts cops ajudat, a recorre'l. Per aquest motiu vull dedicar a totes aquestes persones aquesta tesi, perquè sense el seu granet de sorra això no hauria sigut possible.

Primer de tot vull agrair als meus directors, el Dr. Eduardo Soriano i al Dr. Ramón Martínez, per haver-me donat l'oportunitat de fer aquesta tesi sota la seva direcció. Al Dr. Eduardo Soriano, per haver confiat en mi i rescatat-me dos anys després d'haver fet el treball de màster al laboratori i poder seguir amb la feina que vaig començar just després de sortir de la carrera, i donar-me l'oportunitat de seguir formant-me com a científica. I al Ramón, el meu "papi" científic, gràcies per haver-me ensenyat tant. Gran part del que sé i del que he aconseguit t'ho dec a tu, a la teva ment privilegiada i a la gran persona que ets. Espero ser sempre la teva "Golden Girl". Has sigut un gran director tot i estar a l'altre punta del món.

També vull agrair al Xavier Navarro i al Jaume del Valle l'oportunitat de col·laborar amb ells i fer possible així la meva primera publicació (el meu nom surt al pubmed!!!).

Fa poc algú em va preguntar quan vaig prendre la decisió de ser biòloga. No vaig saber què respondre. Després de donar-li voltes vaig adonar-me que la passió per la natura i la biologia em venia de molt petita. El gran "culpable" ets tu avi. Així que et dec un gran GRÀCIES per portar-me pels boscos de Sant Hilari des de ben petita, per ensenyar-me el nom de tots els arbres i plantes que ens trobàvem, gràcies per recordar-me mil i una vegades que jo era una nena de bosc. Vas mostrar-me l'inici del meu camí cap a la biologia.

També vull dedicar-li un agraïment a la meva professora de biologia de l'escola, la Montserrat Vinyallonga, que va aconseguir fer de la biologia la millor assignatura.

Als meus companys de carrera, que em van acompanyar durant l'inici d'aquesta aventura, compartint grans moments, dinars eterns a la gespa, tardes llarguíssimes de pràctiques, nits boges d'Apolo... A l'Alex, amb el seu amor pels animals que tan la caracteritza i els seus rituals pre-exàmens (al final sembla que si que funcionaven, no?). A la Núria, per

tantes experiències a dins i a fora de la universitat. A la Tati, la Sara, la Blanca i la Cris que transformàveu les pràctiques en tardes de riures. A les Olgues, la Mar i la Clara, per tantes nits després del primer karaoke al xino. Al Marc i al Berron, per estar sempre disposats a liar-la. Al Vallejo, l'home del somriure etern. I al David, per estar-hi sempre, des de la cua per comprar la bata el primer dia de classe, a mil viatges en metro, treballs, cafès (bueno, te vermell en got!) i aventures. Sense vosaltres aquest camí hauria sigut molt més avorrit!

Gràcies als post-docs del lab: al Lluís, al Ferran, al Jesús, a la Marta i els seus organotípics, a la Tiziana i els seus ratolins (quina herència que em vas deixar,,,,), al Fausto i les seves converses que poden anar des de l'últim partit de l'espanyol fins a si hi ha vida fora del planeta terra, a la Yas pels seus consells molt més enllà del professional i a l'Ash el déu del lab.

Gràcies a tots als companys que han format part dels Soriano's lab. A la primera tanda de PhD que vaig conèixer: la Bea, la Mar, la Sara, l'Esther, la Núria, la Dani, la Sere, el Carles, el Román i l'Oriol (el culpable de que sigui la noia "experta" en disseccions). Gràcies pel bon rotllo que transmeteu i perquè vaig veure per primera vegada el que era una "família de doctorat". A la nova tongada d'estudiants: l'Alba i l'Eva. Que tot i no haver passat gaire temps juntes, només he necessitat un parell de scape rooms per saber que també fareu la vostra família.

Gràcies als no-Soriano que també han format part d'aquesta etapa. A l'Andreu per un congrés a Berlin, entre pósters i birres, difícil d'oblidar. A un curt però intens equip de futbol *Dracarys* (segur que més d'una vegada m'heu maleït). Ha sigut un plaer aportar el meu "estil de joc" al vostre equip.

Un punt i a part us mereixeu dos dels "tres mosqueteros" del parc. Gràcies Victor pels dinars i les visites a mitja tarda per parlar de futbol, bàsquet, comunio i de qualsevol cosa menys de ciència. I a l'Artur (Arturitooooo!!!) pel teu sentit de l'humor, la teva ironia, el teu saber escoltar i per donar els millors consells. Sou uns cracks!

A l'Anna i l'Alícia, perquè per molt que passin els anys, sempre formen part del camí!

Gràcies als meus companys d'aventura, a la meva PhD Family. Buff complicat resumir en 3 línies aquests quatre anys! Al Toni, per tantes hores a cultius, marujeos i riures. Per ensenyar-me que els controls dels experiments existeixen, i que el PFA s'obre a la

campana!! A l'Alba, la meva andalusa preferida. Quants quilòmetres ens hem fet juntes? Per la millor companya de classes de ioga, de cafès de cada matí i de xerrades interminables en les que arreglem el món. I al Marc, el meu germà de tesi (RAMONES TEAM forever!!). Per tots els experiments fallits, rafts a 4 graus, disseccions, hores d'estabulari, liades al laboratori (per algo ens diuen els terroristes del lab), i per totes les hores de teràpia entre pitis i cokes. Aquests quatre anys m'han regalat uns amics que m'emporto per sempre.

I per últim, i per això no menys important, a la meva família. En especial als meus pares. Per estar sempre que ho he necessitat. Per escoltar-me, aconsellar-me, recolzar-me i confiar en mi. Per ajudar-me a aixecar-me quan he caigut i per recordar-me cada dia qui soc i com soc. Senzillament, per estimar-me incondicionalment, amb el 100% de connotacions que això implica. I al Toni. Per conviure, literalment, amb l'aventura de fer aquesta tesi. Per estar al meu costat en tot moment i acompanyar-me al llarg d'aquest viatge, durant tants anys, i tots els que venen.

I com a part de la família que són, no puc deixar d'agrair als meus familiars de quatre potes, al Titus i a la Toffee, la seva petita aportació. Perquè les millors idees i reflexions han sorgit en els llargs passejos al seu costat, i per alegrar-me els dies, independentment dels resultats.

MOLTES GRÀCIES!!!

Sinopsi

During the nervous system development, neurons have to migrate and extend their axons to connect with their targets. In this process a huge amount of axon guidance molecules and their receptors participate to produce axon attraction or repulsion, guiding them to their final position. The growth cone has a key role in this process because the majority of receptors are localized in its surface and is where membrane turnover takes place. SNARE proteins are important components for membrane fusion in both, exocytosis and endocytosis, and their participation in axon guidance has been recently described. One important molecule during the nervous system development is Netrin-1. This guidance cue has different receptors and has the ability to produce attraction or repulsion depending on the receptor it binds. Recent studies have demonstrated that one of the SNARE proteins, Syntaxin-1, interacts with the Netrin-1 receptor DCC and that this interaction is necessary for the attraction of the commissural neurons *in vitro*. However, limited *in vivo* studies have been done to evaluate the role of SNARE proteins in axon guidance. For this reason, in this thesis we study the role of SNARE proteins, specifically Syntaxin-1, during the commissural neuron guidance in three different animal models (fly, chicken and mouse). By deleting SNARE genes, we demonstrate that Syntaxin-1 is necessary for the correct commissural axon guidance and the correct spinal cord development in these three species. Furthermore, we confirmed that loss of function of Syntaxin-1 results in a reduced sensitivity of commissural neurons to Slit-2 and Netrin-1. Moreover, we demonstrate that the role of Syntaxin-1 is conserved in different axon guidance processes such as repulsion mediated by Slit/ROBO and Netrin-1/UNC5 in the commissural neurons of the spinal cord and in EGL neurons, respectively.

The mechanisms that regulate axon growth during development are very similar to processes that take place during axon regeneration. A variety of axon guidance receptors is localized in membrane microdomains enriched in cholesterol, termed lipid rafts, whose functionality depends on the proper localization within these microdomains. Here, we explored the effect of cholesterol depletion in both, developing neurons and regenerating axons. We demonstrate that cholesterol depletion with three different drugs increases neurite growth, growth cone area, filopodia density and branching in immature neurons of the central and peripheral nervous system *in vitro*. Next we

performed axon regeneration experiments and we demonstrate that cholesterol depletion enhances axon regeneration after axotomy *in vitro* in dissociated hippocampal neurons and in slice organotypic cultures. On the other hand, we show by electrophysiology and Pinprick test that cholesterol depletion enhances axon regeneration after sciatic nerve axotomy *in vivo*.

Finally, we study in more detail how Nystatin, the most effective drug used to disrupt lipid rafts, enhances axon regeneration. We demonstrate that acute Nystatin treatments enlarge growth cone areas and activate two different pathways, NO at lower doses and Akt phosphorylation at higher doses. Moreover, we show that longer treatments at the lowest dose, increase hippocampal axon elongation and regeneration *in vitro*, increasing NO levels due to nitric oxide synthase activation. When nitric oxide synthase is inhibited, the increase of the growth cone size, filopodia density and axon regeneration after Nystatin treatment does not occur.

Our experiments indicate that membrane fusion proteins like Syntaxin-1 are important in axon guidance and development, and that lipid membrane composition is essential for axon growth and regeneration.

Índex

Índex general

Índex

Índex general	1
Índex de figures	5
Índex d'abreviatures	7
1. Introducció	11
Capítol 1: Formació de la neurona.	13
1.1. La polarització neural.	13
1.1.1. Formació de l'axó.	13
1.2. El desenvolupament neural <i>in vitro</i> .	17
Capítol 2: La Guia Axonal.	19
2.1. Molècules de guia axonal.	19
2.1.2. Netrina-1.	21
2.1.2.1. Receptors de Netrina-1.	21
2.1.2.2. Funcions de la Netrina-1 durant el desenvolupament del SNC.	22
2.1.3. Slit.	24
2.1.3.1. Receptors de Slit.	24
2.1.3.2. Funcions de Slit durant el desenvolupament del SNC.	25
Capítol 3: Creixement Axonal.	27
3.1. El conus de creixement.	27
3.1.2. Dinàmica del citoesquelet.	28
3.2. Transport de membrana i creixement.	32
3.2.1. Les proteïnes SNARE.	32
3.2.1.2. La Sintaxina-1 (STX1).	36
Capítol 4: Microdominis de membrana <i>Lipid Rafts</i> .	38
4.1. Composició i estructura.	38
4.2. Dinàmica i regulació.	40
4.3. Mecanismes d'estudi dels <i>lipid rafts</i> .	42
4.4. Funcions fisiològiques dels <i>lipid rafts</i> durant el desenvolupament del SN.	43
4.4.1. <i>Lipid rafts</i> i guia axonal.	44

4.4.2. <i>Lipid rafts</i> , creixement i regeneració neural.	44
Capítol 5: Regeneració.	47
5.1. La mielina.	47
5.2. Regeneració del SNC vs. SNP.	47
5.2.1. Factors extrínsecs.	48
5.2.2. Factors intrínsecs.	49
5.3. Mecanismes moleculars de la regeneració axonal.	50
5.4. Via de senyalització PI3K/Akt	53
5.5. L'òxid nítric.	55
2. Objectius	57
Informe sobre les publicacions derivades d'aquesta tesi	61
3. Resultats	65
- A conserved role for Syntaxin-1 in pre- and post-commissural midline axonal guidance in fly, chick, and mouse.	67
- Cholesterol Depletion Regulates Axonal Growth and Enhances Central and Peripheral Nerve Regeneration.	101
- Nystatin regulates axonal extension and regeneration by modifying the levels of nitric oxide.	121
4. Discussió	149
1. Guia axonal: estudi de la STX1 en diferents models animals in vivo.	151
1.1. Conservació de la STX1 entre espècies.	152
1.2. Paper de la STX1 en el desenvolupament de la línia mitja en <i>D.melanogaster</i> .	152
1.3. Paper de la STX1 en el desenvolupament de la medul·la espinal de pollastre i ratolí.	153
1.4. Importància de la STX1 en la via de senyalització Slit-2/ROBO, Netrina-1/DCC durant el desenvolupament de la medul·la espinal de pollastre i ratolí.	154
1.5. Conservació de la funció de la STX1 en altres estructures del SN.	156
1.6. Paper de la STX1 en l'arribada a la membrana de ROBO 3.	158
2. Regeneració neural: <i>lipid rafts</i> , Akt i NO.	161
2.1. Impacte del colesterol de membrana en el creixement <i>in vitro</i> de les neurones immadures.	162
2.2 Paper dels <i>lipid rafts</i> en la regeneració del SNC i SNP <i>in vitro</i> .	166
2.3. Paper dels <i>lipid rafts</i> en la regeneració del SNP <i>in vivo</i> .	169

2.4. Mecanismes d'acció de la Nistatina.	171
2.5. Importància del NO en el creixement i regeneració axonal.	172
5. Conclusions	179
Bibliografia	183

Índex de figures

Introducció

Capítol 1: Formació de la neurona.	
Fig1. Polarització neural.	17
Fig2. Desenvolupament de les neurones d'hipocamp <i>in vitro</i> .	18
Capítol 2: La Guia Axonal.	
Fig3. Principals molècules de guia axonal.	20
Fig4. Senyalització a través dels receptors DCC i UNC5.	21
Fig5. Guia axonal de les neurones comissurals durant el desenvolupament de la medul·la espinal de vertebrats (ratolí) i la línia mitja en invertebrats (<i>Drosophila melanogaster</i>) a través de la senyalització de Netrina-1 i Slit.	26
Fig6. Desenvolupament del cerebel.	24
Capítol 3: Creixement Axonal.	
Fig7. Estructura del conus de creixement.	28
Fig8. Etapes del creixement axonal.	28
Fig9. Formació d'una ramificació.	31
Fig10. Transport vesicular dependent de complexos SNARE.	34
Fig11. Hipòtesi formació del complex SNARE.	35
Capítol 4: Microdominis de membrana <i>Lipid Rafts</i> .	
Fig12. Estructura convencional dels <i>lipid rafts</i> .	39
Fig13. Heterogeneïtat dels <i>lipid rafts</i> .	41
Capítol 5: Regeneració.	
Fig14. Regeneració al SNC i al SNP.	49
Fig15. Transformació d'un axó tallat en un nou conus de creixement.	52
Fig16. Via de senyalització PI3K/Akt.	53
Fig17. Via de senyalització NO/cGMP/PKG.	56

Discussió

1. Guia axonal: estudi de la STX1 en diferents models animals <i>in vivo</i> .	
Fig18. La STX1 és necessària per la resposta envers Slit-2 i Netrina-1 en medul·la espinal i EGL de ratolí.	156

2. Regeneració neural: *lipid rafts*, Akt i NO.

Fig19. Esquema resum del possible mecanisme d'acció de la Nistatina. 175

Fig20. Efectes de la membrana en el creixement. 177

Índex d'Abreviatures

(e/i/n)-NOS	òxid nítric sintasa (endotelial(induïble/neural) (<i>endothelial/inducible/neuronal - nitric oxide synthase</i>))
ABP	<i>actin binding protein</i>
AIS	<i>Axon Initial Segment</i>
Arp 2/3	proteïna associada a la actina 2/3 (<i>actin-related protein 2/3</i>)
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CAM	molècules d'adhesió cel·lular (<i>cell adhesion molecule</i>)
CaM	calmodulina
CaMKK	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
Cdc42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
ChOx	colesterol oxidasa
CRMP2	<i>collapsin response mediator protein family</i>
CSPG	condroïtin-sulfats proteoglicans
DAF-FM	<i>4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate</i>
DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
DIV	<i>dies in vitro</i>
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>
DRM	dominis de membrana resistents als tractaments amb detergents (<i>detergent resistance membrane</i>)
DSCAM	<i>down syndrome cell adhesion molecule</i>
E(n)	estadi embrionari dia (n)
EC	escorça entorrinal
ECM	matriu extracel·lular (<i>extracellular matrix</i>)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGL	capa granular externa (<i>external granular layer</i>)

ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
F-actina	filament d'actina
FEME	endocitosi ultraràpida
Foxo	<i>forkhead box O family transcription factor</i>
G-actina	actina soluble
GAP43	<i>growth associated protein 43</i>
GDNF	<i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GFRα	<i>growth factor receptor alpha</i>
GL	capa granular (<i>granular layer</i>)
GM1	<i>monosialotetrahexosylganglioside 1</i>
GPI	<i>glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein</i>
GPL	glicerofosfolípid
GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
GSL	glicoesfingolípid
GPMV	<i>cell-derived giant plasma membrane vesicles</i>
GUV	<i>giant unilamellar vesicles</i>
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IGL	capa granular interna (<i>internal granula layer</i>)
KO	<i>knockout</i>
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
L-NMMA	<i>N^G-Monomethyl-L-arginine, monoacetate salt</i>
MAG	glicoproteïnes associades a la mielina (<i>myelin associated glycoprotein</i>)
MAP	proteïnes associades als microtúbuls (<i>microtubule associated protein</i>)
MBP	proteïna bàsica de la mielina (<i>myelin basic protein</i>)
ML	capa molecular (<i>molecular layer</i>)
mTOR; mTORC1/2	<i>mammalian target of rapamycin; complex 1/2</i>
MβCD	metil- β -ciclodextrina
NELL2	<i>neural epidermal growth factor-like-like 2</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NgR	<i>Nogo receptor</i>

Nm	nanòmetre
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein</i>
NT3	neurotrofina 3
NO	òxid nítric (<i>nitric oxide</i>)
OMGP	<i>oligodendrocyte-myelin glycoprotein</i>
P(n)	estadi post-natal dia (n)
PAR	<i>partitioning defect complex</i>
PC	cèl·lula de Purkinje (<i>Purkinje cell</i>)
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PK1	quinasa 1 dependent de fosfoinosítid (<i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>)
PH	domini homòleg a la plecstrina (<i>pleckstrin homology domain</i>)
PHLPP1/2	<i>PH-domain leucine-rich-repeat-containing protein phosphatases</i>
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinasa (<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>)
PIP; PIP2; PIP3	fosfatidilinositol fosfat; bifosfat; trifosfat
PKA	<i>protein kinase A</i>
PKB	<i>protein kinase B / Akt</i>
PKG	<i>protein kinase G</i>
PLP	<i>proteolipid protein</i>
PMP-22	<i>peripheral myelin protein 22</i>
PPV	vesícules precursors del plasmalemma (<i>plasmalemmal precursor vesicles</i>)
PP2A	<i>protein phosphatase 2</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
p75NTR	<i>neurotrophin receptor p75</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAG	gens associats a la regeneració (<i>regeneration associated genes</i>)
RGMa	<i>repulsive guidance molecule BMP co-receptor A</i>
Rho, RhoA	<i>Ras homologous, Ras homologous A</i>
ROBO	<i>roundabout</i>

ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Sema	semaforina
Ser	serina
sGC	guanilat ciclasa soluble (<i>soluble guanylyl cyclase</i>)
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SN	sistema nerviós (<i>nervous system</i>)
SNAP	proteïna associada a sinaptosoma (<i>synaptosomal-associated protein</i>)
SNARE	<i>soluble NSF-attachment proteins</i>
SNC	sistema nerviós central (<i>central nervous system</i>)
SNP	sistema nerviós perifèric (<i>Peripheral Nervous System</i>)
SOD1	<i>Cu/Zn superoxid dismutase 1</i>
SPT	<i>single particle tracking</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STX; STX1A/B	sintaxina; sintaxina 1A/B
t/v-SNARE	<i>target/vesicle SNARE</i>
TAG-1	<i>transiently expressed axonal glycoprotein-1</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
Thr	treonina
Ti-VAMP	<i>tetanus neurotoxin insensitive VAMP</i>
Trk	receptor tirosina quinasa
TrkB	receptor tirosina quinasa B
UNC5	<i>uncoordinated protein-5</i>
VAMP	proteïna de membrana associada a vesícules (<i>vesicle-associated membrane protein</i>)
VASP	<i>vasodilatador stimulated phosphoprotein</i>
WASP	<i>wiskott-aldrich syndrome protein</i>
WNT	<i>wingless int-1</i>
WT	salvatge (<i>wild-type</i>)



1. Introducció

Capítol 1: Formació de la neurona.

Durant el desenvolupament, les neurones pateixen grans canvis en la seva morfologia, a través d'un procés anomenat polarització neural, mitjançant el qual passen de ser una cèl·lula esfèrica i multipolar, amb petites projeccions anomenades neurites, a una cèl·lula complexa formada per dos compartiments ben diferenciats: el somatodendrític i l'axonal.

1.1. La polarització neural.

La polarització proporciona l'asimetria a la neurona necessària per la seva funcionalitat. Permet transmetre informació de forma unidireccional a través de l'axó, des de les dendrites o el soma fins al terminal sinàptic, on s'alliberen neurotransmissors que són captats per les dendrites de les neurones veïnes. La polarització neural i el seu manteniment al llarg de la vida de la cèl·lula és crucial pel correcte desenvolupament i funcionalitat del sistema nerviós (SN) (Takano et al., 2015).

1.1.1. Formació de l'axó.

El procés de polarització neural està regulat per tres factors: senyals extracel·lulars, vies de senyalització intracel·lulars i la localització subcel·lular dels orgànuls i proteïnes.

In vivo, les neurones es troben envoltades d'un ambient ric en molècules de senyalització que poden promoure la polarització. Les principals senyals extracel·lulars que intervenen en la polarització neural són les molècules presents a la matriu extracel·lular (ECM, de l'anglès *extracellular matrix*) tals com la laminina (Lei et al., 2012) i les N-cadherines (Dotti et al., 2015), factors de creixement com el BDNF (de l'anglès *brain-derived neurotrophic factor*), la neurotrofina 3 (NT3), el TGF β (de l'anglès *transforming growth factor β*), la IGF1 (de l'anglès *insulin-like growth factor 1*), WNT (de l'anglès *wingless int-1*, (Nusse et al., 1991) (Cheng et al., 2011)(Nakamuta et al., 2011) i molècules de guia axonal com la Netrina-1 i la Semaforina3A, que activen cascades de senyalització per a que una de les neurites

multipolars comenci a créixer més que la resta i esdevingui un axó (Takano et al., 2015)(Namba et al., 2015)(Takano et al., 2019).

Existeixen diferents vies de senyalització intracel·lulars que promouen la formació de l'axó (Takano et al., 2015)(Namba et al., 2015)(Schelski and Bradke, 2017)(Takano et al., 2019):

- La unió del BDNF al seu receptor tirosina quinasa B (TrkB) indueix un increment de cAMP (de l'anglès *cyclic adenosine monophosphate*) a través de la PKA (de l'anglès *protein kinase A*). La PKA activa l'adenosina 3',5'-monofosfat (cAMP)-LKB1 (de l'anglès *liver kinase B1*) que fosforila les proteïnes associades als microtúbuls (MAPs) com la Tau, promovent la formació de l'axó a través de l'estabilització dels microtúbuls (Shelly et al., 2007)(Takano et al., 2019). La PKA també promou la secreció de més BDNF i el transport actiu de TrkB, a través de la cinesina1, a la membrana (Takano et al., 2019). D'aquesta manera es crea un cercle de retroalimentació positiu a l'extrem de la neurita que es transformarà en axó. L'activació de TrkB també activa la via de Rac1 (de l'anglès *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) que provoca l'especificació de l'axó a través de l'activació de la proteïna Shootin1, que està involucrada en la formació de l'axó (Miyamoto et al., 2006)(Namba et al., 2015)(Schelski and Bradke, 2017)(Takano et al., 2019).

- La unió de diferents neurotrofines als seus receptors activa la via de Ras (Schelski and Bradke, 2017)(Takano et al., 2019). Ras activarà la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) que produirà fosfatidilinositol trifosfat (PIP3) i això activarà la PKB, (de l'anglès *protein kinase B*, també anomenat Akt) que al seu torn inhibeix GSK3 β (de l'anglès *glycogen synthase kinase 3*) que porta a una activació de les MAPs, que promouen l'estabilització dels microtúbuls, i de la CRMP2 (de l'anglès *collapsin response mediator protein family*), que a part d'estabilitzar els microtúbuls, regula l'endocitosi, el tràfic vesicular de receptors com el TrkB a la membrana, i la reorganització del citoesquelet d'actina (Arimura and Kaibuchi, 2007). La PI3K també activa Cdc42 (de l'anglès *cell division control protein 42 homolog*) i el complex PAR (de l'anglès *partitioning defect complex*) format per PAR3, PAR6 i aPKC (de l'anglès *atypical protein kinase C*). El complex PAR actiu és capaç d'activar Rac1 i aquesta, a part d'activar Shootin1, activa novament la PI3K, formant així un circuit de retroalimentació positiu a l'extrem de la neurita que esdevindrà axó (Schwamborn

and Püschel, 2004)(Arimura and Kaibuchi, 2007). S'ha vist que aquest circuit de retroalimentació positiu és vital per a que es produeixi la polarització (Takano et al., 2019).

- La via de la CaMKK (de l'anglès *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*): la via és activada per la NT3, que produeix un increment de calci i l'activació de la via. Com a conseqüència, es forma un nou axó i també participa en la seva elongació (Nakamuta et al., 2011).

Aquestes vies de senyalització no només estan connectades entre elles sinó que es retroalimenten. Això fa que la senyal s'amplifiqui només en aquella neurita que esdevindrà axó. Per exemple, l'activació de Ras i de PKA convergeixen en l'activació del circuit PI3K/Cdc42/complex PAR/Rac1 (Takano et al., 2019).

La polarització es dona també en neurones cultivades *in vitro*, on la majoria de les senyals extracel·lulars mencionades anteriorment no hi són presents. Això posa en evidència que els neurones tenen la capacitat inherent de polaritzar-se (Namba et al., 2015). Recentment s'ha descrit que les neurotrofines secretades per les mateixes neurones serien les responsables de la polarització neural *in vitro* (Takano et al., 2019). Els seus receptors són transportats per la cinesina1 a l'extrem de la neurita que esdevindrà axó, de manera que s'activen les diferents vies anomenades anteriorment. L'activació de totes aquestes vies porta a una reorganització del citoesquelet que afecta a la dinàmica dels microtúbuls i de l'actina (Takano et al., 2019).

Els microtúbuls de l'axó, regulats per les MAPs, són molt estables i tenen una distribució molt uniforme, amb l'extrem positiu pel creixement situat a la part més distal de l'axó. Les dendrites, en canvi, no tenen una orientació unidireccional de creixement dels seus microtúbuls. L'orientació és clau per la polarització, ja que d'ella en depèn el transport de moltes proteïnes necessàries per la neurona (Namba et al., 2015)(Schelski and Bradke, 2017). La formació de filaments d'actina també és important per definir el compartiment axonal. L'actina és més inestable i dinàmica als axons en creixement que a les dendrites (Bradke and Dotti, 1999). Just després de la polarització, es crea una xarxa de filaments d'actina que impedeix la difusió d'elements citoplasmàtics cap a l'axó, fent de barrera entre l'espai axonal i el somatodendrític. Aquests filaments estan col·locats de manera que el seu

extrem positiu pel creixement està orientat cap al soma de la neurona, afavorint així l'allunyament de l'axó (Watanabe et al., 2012). Aquesta xarxa d'actina no es troba mai a les dendrites i sembla que es forma just abans de que comenci a créixer el segment inicial de l'axó (AIS, de l'anglès *Axon Initial Segment*), on els microtúbuls també hi intervenen (Zhao et al., 2017)(Papandreou and Leterrier, 2018).

L'AIS té un paper important en la formació de la barrera entre l'espai axonal i somatodendrític, com a regulador de potencials d'acció i de proteïnes de transport, i si es trenca, es perd la polarització de la neurona i la funcionalitat de la cèl·lula. Per tant, la coordinació d'ambdós elements del citoesquelet és clau per la polarització de la neurona (Lewis et al., 2013)(Namba et al., 2015)(Zhao et al., 2017)(Miller and Suter, 2018).

També hi ha senyals inhibidores, que promouen un estadi multipolar, impedit el creixement de les neurites i la formació de l'axó. S'ha descrit que una de les proteïnes involucrades és RhoA (de l'anglès *Ras homologous A*), que es troba més activa en els conus de creixement de les neurites que al dels axons polaritzats (Takano et al., 2015).

Així com els mecanismes que promouen la formació de l'axó estan ben estudiats i descrits, de la formació de les dendrites no se'n sap massa. La hipòtesi més generalitzada és que hi ha un ambient inhibitori global a les neurites, que les manté en un estat de creixement i retracció fins que un senyal extern activa una de les cascades descrites anteriorment i la neurita entra en un ambient d'activació local on participen molècules com Rac1, PI3K, PIP3, Cdc42 i el complex PAR, formant el circuit de retroalimentació positiu que promourà el creixement d'aquesta neurita (Takano et al., 2019). S'han proposat diferents models per explicar aquesta hipòtesi. Un primer model es basa en la limitació dels factors. L'acumulació local d'una molècula que promogui el creixement de l'axó en una sola neurita, com el complex PAR o el cAMP, provoca que només aquesta pugui esdevenir axó (Schelski and Bradke, 2017). Més recentment s'ha descrit la presència de circuits inhibitoris de llarga distància. Aquesta inhibició és generada per la NT3, que provoca unes onades de calci des de la neurita que està creixent cap al soma, on activa RhoA (Takano et al., 2017)(Takano et al., 2019). L'activació de RhoA provoca la inactivació de Rac1 i, per tant, s'inhibeix el circuit de retroalimentació positiu del complex PAR a la resta de neurites (**Fig1**) (Lewis et al., 2013)(Takano et al., 2015)(Takano et al., 2017)(Takano et al., 2019).

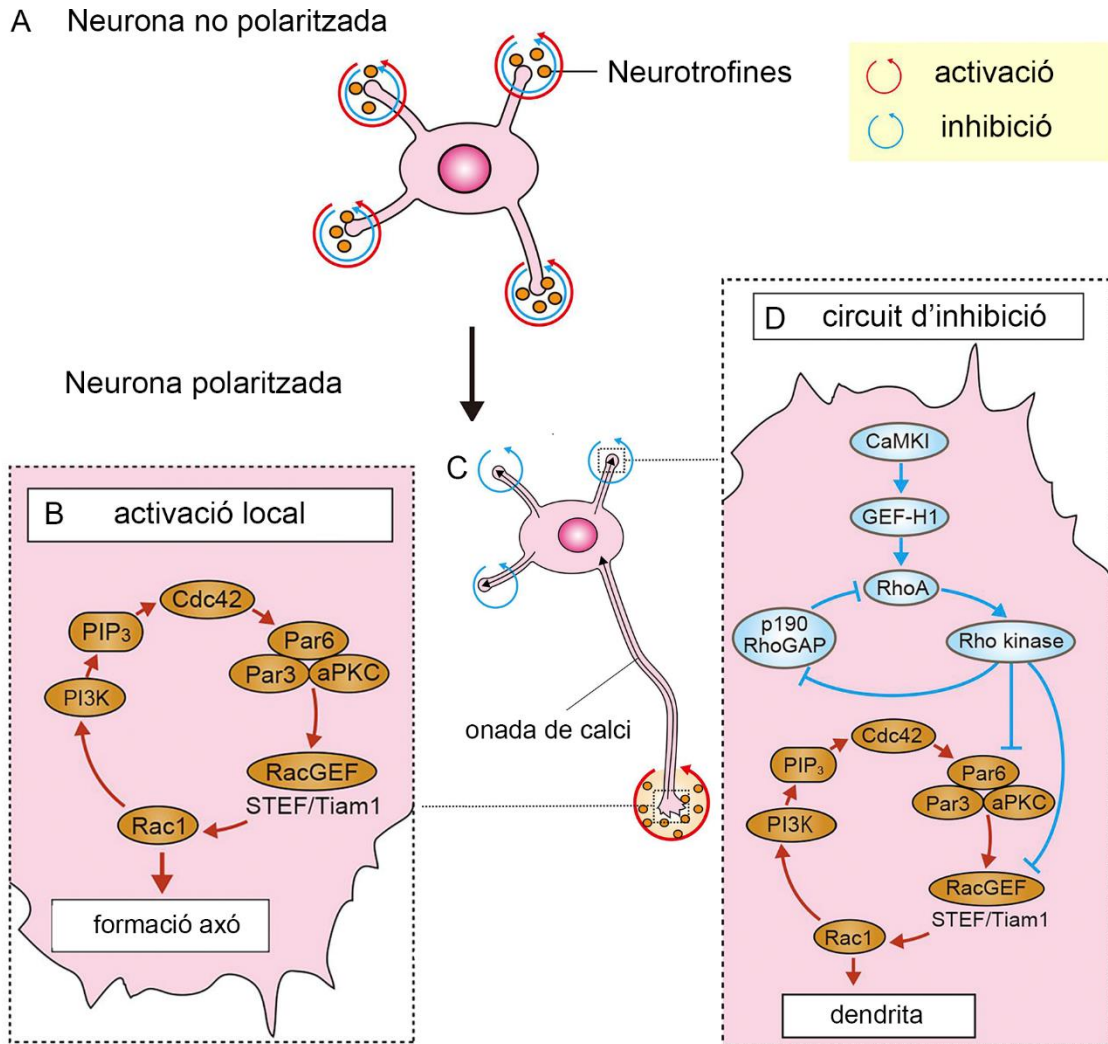


Fig1. Polarització neural. Esquema on es representa el model de polarització neural. (A) A les neurones no polaritzades, les senyals d'activació i inhibició estan equilibrades (fletxes blaves i vermelles). (B) La polarització es dona quan una neurotrofina activa localment el circuit Rac1/PI3K/Cdc42/PAR, produint la formació de l'axó (fletxa vermella). (C) Seguidament es produeix una onada de calci cap al soma que activa el circuit de RhoA (fletxa blava) inhibint la formació de l'axó a la resta de neurites (D).

(imatge modificada de (Takano et al. 2019))

1.2. El desenvolupament neural *in vitro*.

A final dels anys 80 es van descriure les diferents etapes per les que passen les neurones d'hipocamp de ratolí durant el desenvolupament i polarització *in vitro* (Dotti et al., 1988)(Craig and Banker, 1994) (Kaech and Banker, 2006). S'han establert 5 estadis que van des del moment en que es sembren les cèl·lules fins a dia 15 (**Fig2**):

- Estadi 1 (sembra): Les neurones recent sembrades contacten amb el substrat i comencen a emetre lamel·lipodis i fil·lopodis.

- Estadi 2 (neurítogènesi): Cap a les 12 hores i fins a les 36 hores es comencen a veure algunes projeccions que acaben amb conus de creixement. Aquestes projeccions s'anomenen neurites. És un estadi molt dinàmic, on les neurites creixen i es retrauen, però no hi ha un creixement direccional clar.
- Estadi 3 (axogènesi): De les 36 hores fins a dia 3-4, una de les neurites comença a créixer més que la resta i es converteix en axó. Al llarg de l'axó surten fil·lopodis i acaba en un conus de creixement.
- Estadi 4 (dendritogènesi): Fins a dia 7, la resta de neurites segueixen creixent i ramificant-se per formar les dendrites. L'axó també segueix creixent i ramificant-se. Així doncs, veiem estructures cada vegada més complexes.
- Estadi 5 (maduració): A partir del dia 7 fins a dia 15, les neurones ja estan polaritzades, els compartiments dendrític i axonal maduren, es formen sinapsis i espines dendrítiques.

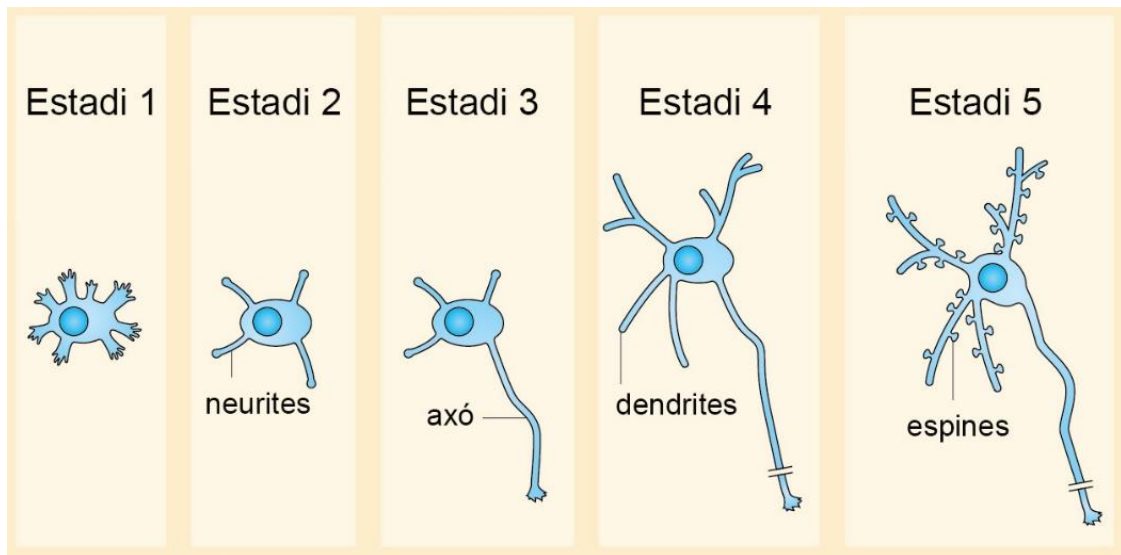


Fig2. Desenvolupament de les neurones d'hipocamp *in vitro*. Esquema on es mostren els 5 estadis del desenvolupament de les neurones d'hipocamp *in vitro*, des del moment de la sembra (estadi 1), la formació de les neurites (estadi 2), de l'axó (estadi 3) i de les dendrites (estadi 4), fins a la formació de les espines (estadi 5).

(imatge modificada de (Takano et al., 2015))

Capítol 2: La Guia Axonal.

El desenvolupament del SN és un procés molt complex i altament regulat en el que intervenen nombrosos passos com la determinació i l'especificació dels diferents tipus cel·lulars, el control de la migració, la guia axonal, la formació de noves xarxes de connexió i la plasticitat sinàptica de les mateixes. Tots aquests processos estan controlats a nivell de factors de transcripció, morfògens, factors de creixement i expressió de proteïnes extracel·lulars, entre d'altres (Chilton, 2006)(Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011)(Ye et al., 2019).

El correcte desenvolupament del SN implica que les neurones han de migrar cap a diferents regions i estendre els seus axons per contactar amb les seves dianes per tal de formar els circuits nerviosos. Per a que això sigui possible, cal una correcte expressió de les molècules de guia axonal i dels seus receptors a la zona corresponent per tal de proporcionar una informació posicional a les neurones (Stoeckli, 2018). Una estructura clau en aquest procés és el conus de creixement, que no només és important per allargar l'axó, sinó que gràcies a la presència de receptors a la membrana, és essencial per detectar les molècules de guia axonal que es troben en l'ambient i respondre a les senyals atractives o repulsives, guiant els axons fins al seu destí (Chilton, 2006)(Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011)(Ye et al., 2019).

La resposta d'atracció o repulsió dependrà de la integració que el conus de creixement fa de totes les senyals de l'entorn (Ye et al., 2019) i també d'altres factors intracel·lulars, com els nivells interns de calci a la neurona i l'equilibri de segons missatgers com el cAMP i cGMP (de l'anglès *cyclic guanosine monophosphate*), de manera que s'activaran diferents cascades de senyalització que remodelaran el citoesquelet i la membrana produint una resposta repulsiva o atractiva segons com variïn els nivells de tots aquests factors (Chilton, 2006)(Forbes et al., 2012)(Akiyama et al., 2016)(Ye et al., 2019).

2.1. Molècules de guia axonal.

Existeixen diferents grups de molècules involucrades en la guia dels axons i la migració cel·lular: factors quimiotròpics difusibles, molècules no difusibles pròpies de

l'ECM, factors de creixement, molècules d'adhesió de superfície cel·lular i receptors de membrana (Chilton, 2006)(Ye et al., 2019). El seu rang d'acció dependrà de la seva naturalesa: en el cas de que siguin difusibles, produiran un gradient que pot actuar a distàncies llargues; mentre que si són proteïnes ancorades a l'ECM o a la membrana cel·lular, el seu efecte tindrà lloc a distàncies curtes, per contacte directe amb el conus de creixement (Fig3).

Hi ha quatre famílies de molècules de guia axonal ben estudiades: les efrines, les semaforines (Sema), les netrines i els slits. Però s'ha vist que altres molècules com els morfògens WNT, Sonic hedgehog (SHH); factors de creixement com el TGFβ/BMP (de l'anglès *transforming growth factor beta/ bone morphogenic protein*) i el BDNF; proteïnes de l'ECM com la laminina; molècules d'adhesió cel·lular (CAMs) com les cadherines i la família de les immunoglobulines, poden actuar també com a molècules de guia axonal (Chilton, 2006)(Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011)(Ye et al., 2019).

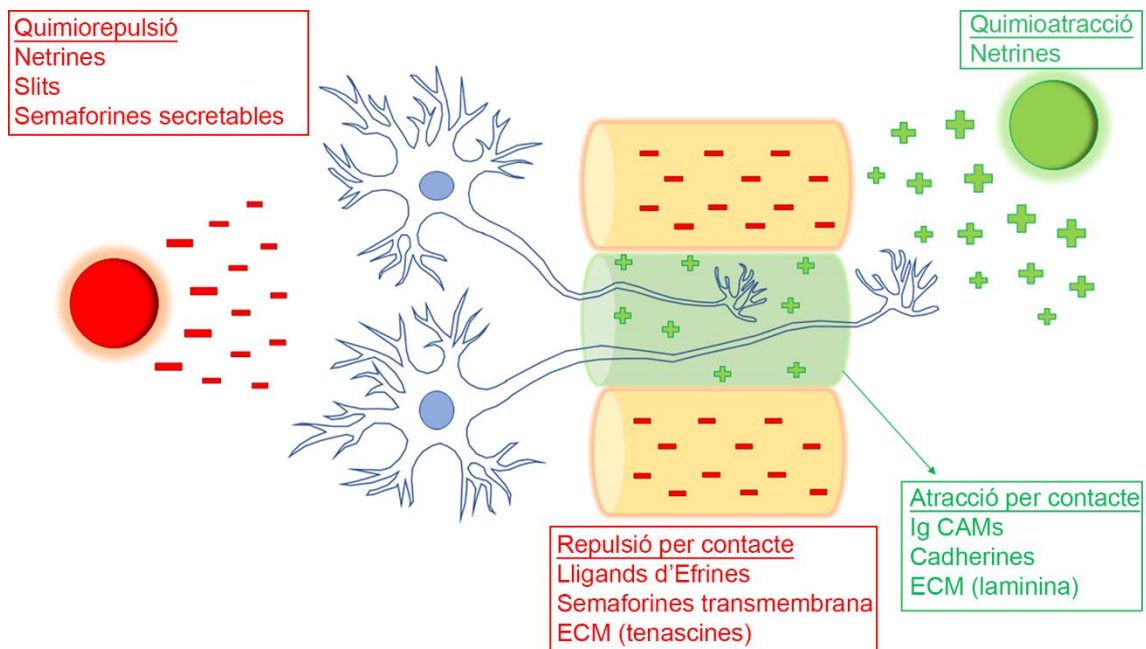


Fig3. Principals molècules de guia axonal. Esquema on es mostren les principals molècules de guia axonal i la resposta que provoquen sobre el conus de creixement. Molècules repulsives (vermell) difusibles o de contacte provoquen que l'axó s'allunyi, mentre que les senyals atractives (verd) difusibles i de contacte provoquen l'efecte contrari. Ambdós tipus de senyal guiaran l'axó fins a la seva diana.

(Imatge modificada de (Chilton 2006))

2.1.2. La Netrina-1.

En mamífers, la família de les netrines està formada per tres netrines secretables que poden actuar a llargues distàncies (Netrina-1,-3 i -4) i dues de transmembrana (Netrina-G1 i -G2). D'entre tots els membres, la que té un paper més important en el desenvolupament del sistema nerviós central (SNC) és la Netrina-1 i tant ella com els seus receptors estan conservats i presenten funcions similars en diferents espècies des de *C.elegans*, *zebrafish* o *Drosophila* fins a peixos i mamífers (Moore et al., 2007)(Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011)(Lai Wing Sun et al., 2011).

2.1.2.1. Receptors de Netrina-1.

La Netrina-1 pot actuar tant com a quimioattractant o com a quimiorepellent segons el receptor al que s'uneixi.

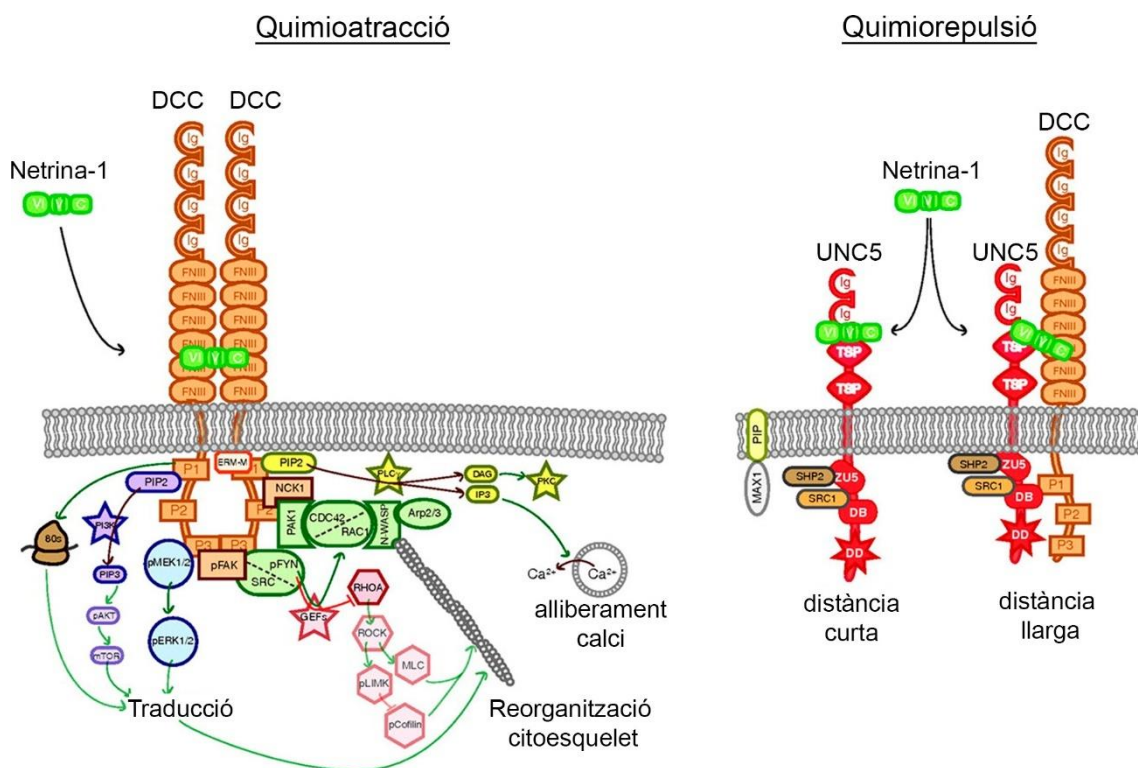


Fig4. Senyalització a través dels receptors DCC i UNC5. Esquema on es mostra la senyalització a través de DCC que causa quimioatracció i dels homodímers UNC5 i heterodímers UNC5-DCC que causen quimiorepulsió quan s'uneixen a la Netrina-1. La seva activació acaba amb una remodelació del citoesquelet que causarà el gir de l'axó cap a una direcció o una altra.

(Imatge modificada de (Lai Wing Sun, Correia, and Kennedy 2011))

Quan s'uneix a homodímers de DCC (de l'anglès *deleted in colorectal cancer*) o heterodímers DCC-DSCAM (de l'anglès *down syndrome cell adhesion molecule*) provoca quimioatracció (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011)(Lai Wing Sun et al., 2011), mentre que si s'uneix a homodímers d'UNC5 (de l'anglès *uncoordinated protein-5*) o heterodímers UNC5-DSCAM provoca quimiorepulsió de curta distància, i si s'uneix a UNC5-DCC, repel·lirà a llarga distància (Fig4). Recentment s'ha descrit que la proteïna Draxina pot unir-se a DCC, UNC5 i DSCAM i també provocar repulsió quan s'uneixen a Netrina-1 (Boyer and Gupton, 2018).

2.1.2.2. Funcions de la Netrina-1 durant el desenvolupament del SNC.

Durant el desenvolupament del SNC en mamífers, la Netrina-1 participa en la formació de diferents estructures. En aquesta tesi utilitzem dos models per estudiar el paper d'aquesta molècula en guia axonal: la medul·la espinal com a model de quimioatracció i el cerebel com a quimiorepulsió.

- Desenvolupament de la medul·la espinal

La línia mitja dels embrions dels animals amb simetria bilateral juga un paper clau en la guia axonal de les neurones comissurals i és essencial per permetre la coordinació d'ambdós costats del cos.

El model clàssic de desenvolupament de la medul·la espinal del ratolí proposa que passats 10-12 dies de gestació embrionari (E10-E12), les neurones comissurals es diferencien a la zona dorsal de la medul·la i projecten els seus axons cap a la zona ventral degut a que la Netrina-1 és secretada des de la placa del terra, creant un gradient que produirà l'atracció d'aquests axons que expressen DCC (Fig5). Quan els axons arriben a la placa del terra, la creuen i al arribar al marge contralateral, els axons comissurals fan un gir de 90° i segueixen creixent rostralment. En aquest punt, els axons són insensibles a la Netrina-1 (Lai Wing Sun et al., 2011). Recentment s'ha demostrat que aquest model no és molt acurat, ja que quan s'elimina la secreció de Netrina-1 de les cèl·lules de la placa del terra, l'atracció de les neurones comissurals es segueix produint i la medul·la es forma correctament (Dominici et al., 2017). Les cèl·lules de la zona ventricular també expressen Netrina-1 i s'ha demostrat que només amb la seva expressió, els axons són guiats cap a la placa del terra (Varadarajan et al., 2017). Altres estudis demostren que per a una correcta

guia dels axons cal la presència d'ambdues fonts, la secretada per la placa del terra que actua com a gradient difusible a llarga distància, i la de la zona ventricular que actua com a substrat d'adhesió dels conus de creixement per guiar els axons fins a la placa del terra (Wu et al., 2019).

La funció de la Netrina-1 i del DCC en la guia axonal durant el creuament de la línia mitja està conservada en diferents espècies. Per exemple, en mosques la Netrina també s'expressa a la línia mitja i atrau els axons de les neurones comissurals dels nervis ventrals que expressen el receptor ortòleg del DCC, *Frazzled* (**Fig5**) (Neuhaus-Follini and Bashaw, 2015).

- Desenvolupament del cerebel

Durant el desenvolupament del cerebel es donen dues onades de proliferació i migració. Una primera onada es dona en l'etapa embrionària (E13-E17) on els progenitors de les neurones granulars surten de la zona superior del llavi ròmbic i migren tangencialment, en l'eix antero-posterior, per sobre de la superfície del primordi cerebel·lós per formar la EGL (de l'anglès *External Granular Layer*). Durant aquesta etapa també es dona la migració dels precursors dels nuclis pre-cerebel·losos, que s'originen a la part inferior del llavi ròmbic. Un cop els progenitors de les cèl·lules granulars del cerebel estan posicionats a la EGL, aquestes segueixen proliferant i és durant les dues primeres setmanes post-natals que es dona la segona onada de migració. En aquest moment, la EGL està dividida en dues, la part superior on es troben els progenitors que es segueixen dividint i la zona inferior on es troben les cèl·lules granulars post-mitòtiques. Aquestes últimes comencen a projectar axons bipolars paral·lels a la superfície i migren radialment, travessant la capa molecular fins a la capa granular interna (**Fig6**) (Chedotal, 2010).

La Netrina-1 participa tant en la primera onada de migració com en la segona. A E13 actua com a quimioattractant dels precursors dels nuclis pre-cerebel·losos, ja que aquests expressen DCC, però no actua sobre els precursors de les neurones granulars del cerebel que es troben a la part superior del llavi ròmbic. En canvi, passats 3-5 dies de desenvolupament post-natal (representat amb les sigles P3-P5), la Netrina-1 regula la migració tangencial i la projecció de les fibres paral·leles de les neurones granulars post-mitòtiques de la EGL, actuant com a quimiorepellent, ja que aquestes expressen els receptors UNC5 (Alcantara et al., 2000)(Lai Wing Sun et al., 2011)(Marzban et al., 2014).

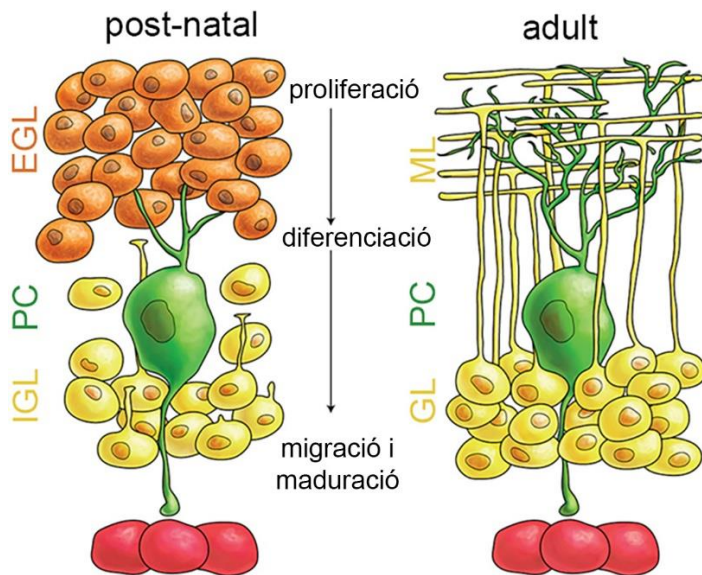


Fig6. Desenvolupament del cerebel.

Esquema representatiu de l'estructura del cerebel post-natal (esquerra) i del cerebel adult (dreta) on es representen les diferents capes i tipus cel·lulars que les formen.

EGL (capa granular externa); IGL (capa granular interna); PC (cèl·lula de Purkinje); ML (capa molecular); GL (capa granular).

(Imatge modificada de (Marzban et al. 2014))

2.1.3. Slit.

Les glicoproteïnes Slit són molècules difusibles implicades en la repulsió axonal. En mamífers existeixen 3 homòlegs de la proteïna difusible Slit (1-3). Aquestes proteïnes participen en el desenvolupament de diferents òrgans, estan involucrats en l'angiogènesi, la tumorigènesi i en la migració de diferents tipus neuronals com les neurones precerebel·loses, però en aquesta tesi ens centrem en la seva participació en la guia axonal en el desenvolupament de la medul·la espinal, juntament amb la Netrina-1 (Blockus and Chédotal, 2016)(Tong et al., 2019).

2.1.3.1. Receptors de Slit.

Els receptors de les molècules Slit són els ROBO (de l'anglès *roundabout*). En mamífers hi ha 4 (ROBO 1-4) i tots ells tenen diferents isoformes formades per *splicing* alternatiu. En guia axonal s'ha vist que els dos receptors més importants són ROBO 1, que al unir-se a Slit provoca repulsió i col·lapse, i ROBO 3, que s'ha descrit que té dues isoformes (ROBO 3.1 i ROBO 3.2). La isoforma ROBO 3.1 té la particularitat d'unir-se molt poc eficientment a Slit (Zelina et al., 2014) i es creu que actuaria com a possible inhibidor de ROBO 1 (Ypsilanti et al., 2010)(Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011)(Blockus and Chédotal, 2016).

2.1.3.2. Funcions de Slit durant el desenvolupament del SNC.

- Desenvolupament de la medul·la espinal

Durant el desenvolupament de la medul·la espinal de ratolí (E10-E12), tal i com he descrit anteriorment, les neurones comissurals són atretes cap a la placa del terra per la Netrina-1. Paral·lelament, la placa del terra també secreta altres molècules repulsives com Sema3B i Slit (1-3) impeding que els axons que han creuat la línia mitja tornin a creuar-la. ROBO 1 i ROBO 3 són els dos receptors de Slit implicats en aquest procés. Les neurones comissurals fan un canvi en els nivells d'expressió d'aquests dos receptors. Mentre que abans de creuar la línia mitja expressen nivells alts de ROBO 3.1, després de creuar-la incrementa l'expressió de ROBO 3.2. Aquest fet provoca que abans de creuar la línia mitja ROBO 1 està inhibit per ROBO 3.1, de manera que els axons no són repel·lits per Slit i a més també interacciona amb DCC ajudant a l'atracció mitjançada per Netrina-1. Un cop els axons han creuat, l'expressió de ROBO 3.1 disminueix, s'expressa ROBO 3.2 i ROBO 1 incrementa la seva expressió a la membrana, de manera que pot unir-se a Slit i això impedeix que els axons tornin a creuar la línia mitja i es doni un correcte desenvolupament de la medul·la espinal (**Fig5**) (Yuan et al., 1999)(Zelina et al., 2014)(Blockus and Chédotal, 2016).

Recentment s'ha descrit un nou lligand secretable per ROBO 3, NELL 2 (de l'anglès *neural epidermal growth factor-like-like 2*), que participa en la repulsió de les neurones comissurals, evitant que creuin la línia mitja. Per tant, ROBO 3 té diferents funcions: provocar repulsió per la unió amb NELL 2, inhibir la repulsió per la unió de Slit amb ROBO 1 abans de creuar la línia mitja i facilitar la unió del DCC amb la Netrina-1 (Jaworski et al., 2015).

Aquest mecanisme de regulació dels ROBO no està conservat en invertebrats. En animals com la mosca la inhibició que faria ROBO 3.1 en les neurones abans d'arribar a la línia mitja ho fa la proteïna endosomal *Commissureless*, que s'uneix a ROBO i el condueix fins al lisosoma on és degradat. Un cop creuada la línia mitja, es deixa d'expressar i ROBO pot arribar a la membrana del conus de creixement, unir-se a Slit i repel·lir els axons per evitar que tornin a creuar la línia mitja (**Fig5**) (Neuhaus-Follini and Bashaw, 2015).

Ratolí (vertebrats)



Drosophila melanogaster (invertebrats)



Fig5. Guia axonal de les neurones comissurals durant el desenvolupament de la medul·la espinal de vertebrats (ratolí) i la línia mitja en invertebrats (*Drosophila melanogaster*) a través de la senyalització de Netrina-1 i Slit.

Panell superior: Esquema representatiu de la guia axonal durant el desenvolupament de la medul·la espinal de ratolí. L'expressió de Netrina-1 a la zona ventricular i la secreció des de la placa del terra, juntament amb l'expressió del receptor DCC, atrau els axons de les neurones comissurals cap a la placa del terra. A més, els receptors ROBO canvien els seus nivells d'expressió per guiar els axons de les neurones comissurals durant el desenvolupament de la medul·la espinal. Primer, ROBO 3.1 inhibeix ROBO 1 per permetre la arribada a la placa del terra (esquerra). Després de creuar-la, l'expressió de ROBO 3.2 permet que ROBO 1 arribi a la membrana i Slit pugui repel·lir els axons fora de la línia mitja (dreta).

Panell inferior: Esquema representatiu de la guia axonal a la línia mitja en mosca. L'expressió de Netrina i el receptor *Frazzled* atrau els axons de les neurones comissurals cap a la línia mitja. L'expressió del receptor *Comissureless* segresta ROBO impedint la repulsió abans de creuar la línia mitja (esquerra). Un cop els axons han creuat, l'expressió dels receptors canvia i ROBO arriba a la membrana on s'uneix a Slit i repel·leix els axons fora de la línia mitja (dreta).

En negre s'indiquen els receptors que s'estan expressant i en gris els que estan silenciosos.

(Imatge modificada de (Ypsilanti, Zagar, and Chédotal 2010))

Capítol 3: Creixement Axonal.

El creixement axonal és un procés que comporta la síntesi de noves proteïnes, un transport vesicular del soma cap a l'extrem més distal de l'axó, la remodelació del citoesquelet i la incorporació de nova membrana plasmàtica. Hi ha almenys quatre condicions *in vivo* on es dona el creixement de l'axó i l'expansió de la membrana. El primer és durant el desenvolupament del SN, quan les neurites creixen per primera vegada; el segon, durant l'allargament dels axons fins que contacten amb les seves dianes i formen sinapsis; el tercer, durant la maduració del SN quan es formen ramificacions i xarxes complexes; i per últim, quan hi ha una lesió i el SN ha de regenerar. Tant en el creixement durant el desenvolupament com en la regeneració, molts dels mecanismes emprats per allargar els axons són similars i en tots els casos el paper clau el té el conus de creixement (Pfenninger, 2009).

3.1. El conus de creixement.

El conus de creixement és una estructura localitzada a l'extrem dels axons especialitzada en l'exploració de l'ambient i on s'integren les senyals en una resposta que es tradueix en un creixement direccional o retracció, resultant en la guia de l'axó. Morfològicament es caracteritza per la presència d'un domini central ric en microtúbuls, mitocòndries i altres orgànuls, un domini perifèric ric en actina on es formen fil·lopodis i lamel·lipodis i un domini de transició ric en estructures d'actina en forma d'arc (**Fig7**) (Schelski and Bradke, 2017)(Omotade et al., 2017).

Els fil·lopodis estan formats per filaments paral·lels d'actina molt dinàmics i la seva funció principal és la d'explorar i contactar amb l'ECM i la membrana d'altres cèl·lules. A la seva membrana es localitzen multitud de receptors que activaran cascades de senyalització per a la reorganització del citoesquelet d'actina i tubulina per tal de permetre el creixement o la retracció de l'axó i a més fan de punt d'ancoratge al substrat, creant una tensió que permet l'expansió del conus (Omotade et al., 2017)(Miller and Suter, 2018).

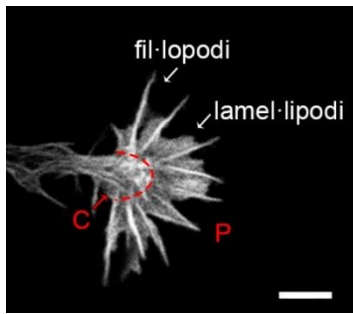


Fig7. Estructura del conus de creixement. Exemple de conus de creixement d'una neurona d'hipocamp on es mostra el domini central (C), el domini perifèric (P) i els fil·lopodis i lamel·lipodis.

Escala: 5µm

3.1.2. Dinàmica del citoesquelet.

Un citoesquelet dinàmic al conus de creixement és vital per a la guia i el creixement axonal. L'elongació de l'axó consta de tres passos que es van repetint cíclicament: la protrusió, l'engruiximent i la consolidació (**Fig8**) (Lowery and Vactor, 2009)(Blanquie and Bradke, 2018).

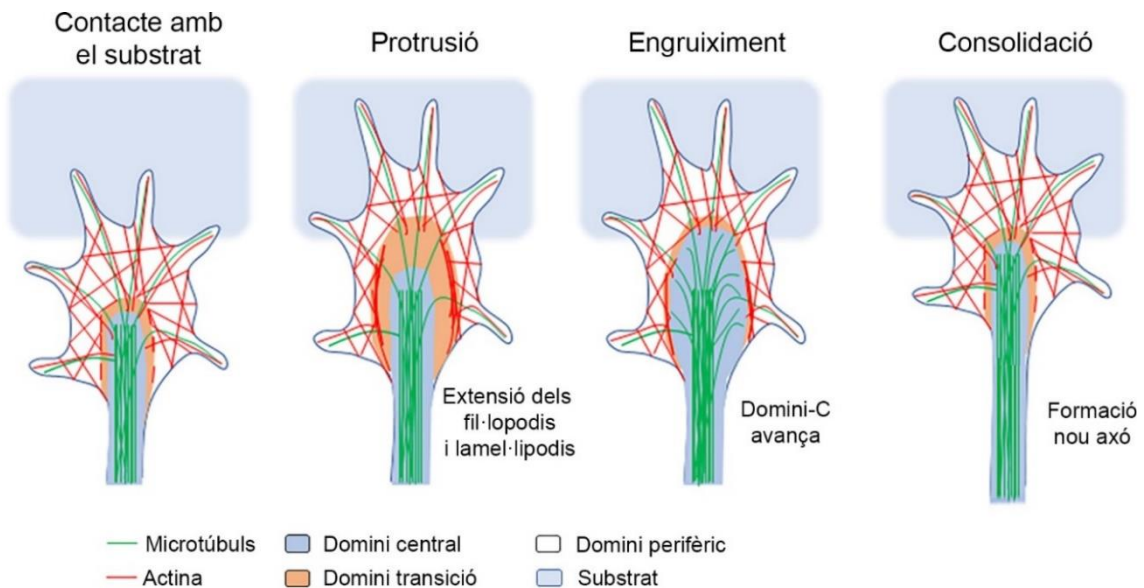


Fig8. Etapes del creixement axonal. Esquema on es representen les etapes per les que passa un axó durant la seva elongació. Un cop contacta amb el substrat, els fil·lopodis i lamel·lipodis s'estenen (protrusió). Seguidament, el citoesquelet d'actina es despolimeritza i el domini central avança degut a la polimerització dels microtúbuls (engruiximent). Finalment es forma el nou segment axonal degut a la compactació de la part proximal del conus de creixement (consolidació).

(imatge modificada de (Lowery and Vactor 2009))

- Protrusió: es dona quan un fil·lopodi contacta amb el substrat i s'activa la senyalització per tal d'activar la polimerització dels filaments d'actina al domini perifèric del conus de creixement amb l'objectiu d'allargar els fil·lopodis i lamel·lipodis.

- Engruiximent: s'activa la despolimerització dels filaments d'actina al domini central donant espai als microtúbuls per tal que puguin polimeritzar i créixer cap al domini perifèric, de manera que es produeix un avançament del domini central.
- Consolidació: la part proximal del conus de creixement es compacta i es forma un nou segment axonal.

Per tal que aquests tres passos es puguin repetir de forma cíclica, cal una regulació tant del citoesquelet d'actina com de tubulina (Schelski and Bradke, 2017)(Omotade et al., 2017).

El citoesquelet d'actina està format per l'actina soluble (G-actina) i l'actina en forma de filament (F-actina). La formació de F-actina està regulada per un gran nombre de proteïnes. La família de les Rho GTPases, com la proteïna RhoA, Rac1 i Cdc42, s'activen per senyals extracel·lulars i fosforil·len proteïnes associades a l'actina (ABP de l'anglès *actin binding proteins*). Dins de les ABP trobem proteïnes que promouen la nucleació com les formines, que incrementen la nucleació als fil·lopodis (Omotade et al., 2017), la proteïna associada a la actina 2/3 (Arp 2/3) i les WASP (de l'anglès *wiskott-aldrich syndrome protein*) que promouen la protrusió del conus de creixement incrementant la nucleació dels filaments d'actina ramificada dels lamel·lipodis i participen en la formació dels intrapodis, que són petits filaments d'actina molt dinàmics que serveixen com a nou punt d'adhesió al substrat i creen les forces de tracció necessàries per la protrusió del conus de creixement (Coles and Bradke, 2015)(Omotade et al., 2017). També hi ha proteïnes elongadores, com Ena/VASP; proteïnes que ancoren el citoesquelet d'actina amb proteïnes de la ECM, com les espectrines; proteïnes que impedeixen la polimerització, com la profilina i la β -timosina; i proteïnes motores que es mouen al llarg dels filaments d'actina, com la superfamília de les miosines (Coles and Bradke, 2015)(Omotade et al., 2017)(Miller and Suter, 2018). La miosina més estudiada en els conus de creixement és la família de la miosina II. La miosina IIa es troba al domini central i a l'axó i té la funcionalitat d'estabilitzar l'axó i provocar forces de contracció, mentre que les miosines IIb i c es troben al domini de transició i perifèric i s'encarreguen de provocar la tracció necessària per l'avançament del domini central del conus de creixement i dels microtúbuls (Miller and Suter, 2018). A part de crear forces de tracció, les miosines permeten el flux retrògrad de l'actina que deixa l'espai necessari per l'avançament dels microtúbuls (Schelski and Bradke,

2017)(Miller and Suter, 2018). Per últim hi ha les proteïnes que promouen la despolimerització dels filaments, com l'ADF/cofilina (de l'anglès *actin-depolymerizing-factor*), que a part d'incrementar la fragmentació i la velocitat de despolimerització de la F-actina, incrementa els punts de nucleació i la concentració de G-actina disponible que pot ser tornada a utilitzar per la polimerització i, com a conseqüència, incrementa la dinàmica del citoesquelet als conus de creixement (Omotade et al., 2017)(Miller and Suter, 2018). L'ADF/cofilina també participa en el flux retrògrad de l'actina, junt amb la miosina II, permetent que els microtúbuls avancin i l'axó creixi (Miller and Suter, 2018). Els microtúbuls es troben estables dins del domini central del conus de creixement, però també trobem petits microtúbuls dinàmics al domini perifèric. Aquests estan regulats principalment per efectors de la via de la PI3K com ho són les MAPs (MAP1B regula els microtúbuls dinàmics de la zona perifèrica i Tau incrementa la rigidesa i estabilitat dels microtúbuls), per Rac1 i pel propi citoesquelet d'actina (Lowery and Vactor, 2009)(Vitriol and Zheng, 2012)(Coles and Bradke, 2015)(Schelski and Bradke, 2017)(Omotade et al., 2017). Els microtúbuls tenen un paper important en el creixement de l'axó per dues raons principals: la força que creen sobre el domini perifèric (aquí és clau la connexió amb el citoesquelet d'actina), i el transport al llarg de l'axó fins al conus de creixement per tal de proporcionar totes les molècules necessàries per allargar l'axó. En aquest transport participen dos tipus de proteïnes motores: les cinesines, que s'encarreguen del transport anterògrad, i les dineïnes, que participen en el transport retrògrad (Lewis et al., 2013).

Per tant, l'increment del creixement dependrà de: la dinàmica dels filaments d'actina per part de les Rho GTPases, la miosina II, l'ADF/cofilina, Ena/Vasp, Arp 2/3 i les formines, entre altres ABP; de l'estabilització dels microtúbuls per les MAPs com Tau i MAP1b; de l'increment de transport cap al conus de creixement per part de les dineïnes i les cinesines; i de la inserció de nova membrana (Schelski and Bradke, 2017)(Omotade et al., 2017). A més, són claus les forces que es creen a l'interior del conus de creixement: les de tracció provocades per la polimerització dels filaments d'actina, i les de contracció per part de la miosina II. De l'equilibri entre aquestes dues forces dependrà que es doni la protrusió i avançament del conus de creixement (Coles and Bradke, 2015). S'ha relacionat el creixement neurític amb onades d'actina que van del soma fins al conus, regulades per proteïnes de transport dels microtúbuls, concretament la cinesina1, i de proteïnes motores com la

miosina1b (Iuliano et al., 2018). Aquestes onades són més freqüents en els axons que en les neurites i incrementen la concentració de l'ADF/cofilina, Rac1 i Cdc42 actives al conus de creixement que promouran la protrusió i elongació de l'axó (Schelski and Bradke, 2017).

La dinàmica del citoesquelet no és únicament important pel creixement de l'axó i la mobilitat del conus de creixement, sinó que també està implicada en el transport i ramificació axonal.

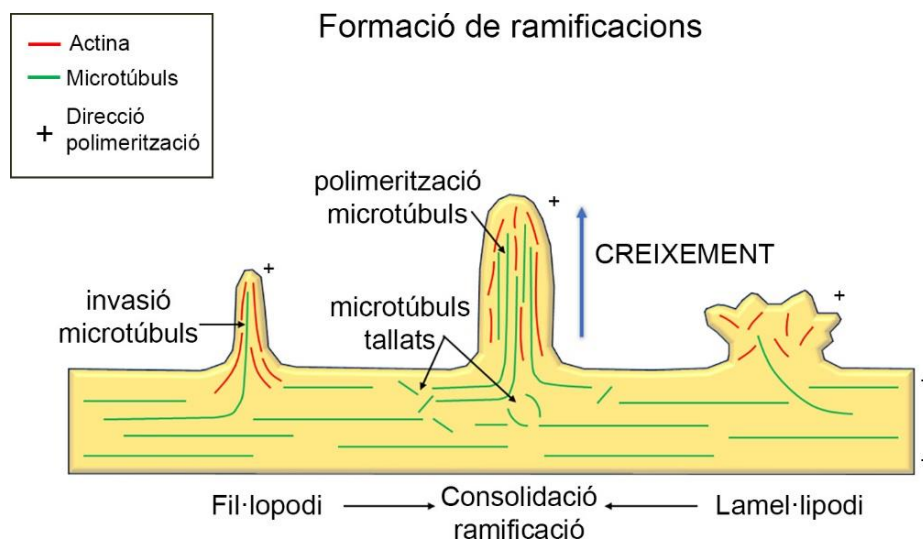


Fig9. Formació d'una ramificació. Esquema on es mostra la dinàmica del citoesquelet d'actina i tubulina per formar ramificacions colaterals al llarg de l'axó. Un cop s'ha format un fil·lopodi o un lamel·lipodi, aquests són envaïts per microtúbuls. En els punts de ramificació es localitzen microtúbuls tallats que facilitaran l'acumulació de proteïnes necessàries per la polimerització del citoesquelet .

(imatge modificada de (Lewis et al., 2013))

La formació de ramificacions és l'últim pas del desenvolupament axonal i permet a un únic axó connectar amb diferents neurones. Hi ha dos mecanismes diferents per dur a terme la ramificació: la primera és que el conus de creixement es bifurqui, cosa que està relacionada amb processos de guia axonal; i la segona és la ramificació colateral al llarg de l'axó. Per poder formar ramificacions colaterals, primer cal que es formin protrusions de filaments d'actina (fil·lopodis i lamel·lipodis), seguit d'una fragmentació dels microtúbuls als punts de ramificació, cosa que aturarà el transport localment i ajudarà a segrestar molècules i orgànuls en el punt on ha de créixer la nova ramificació. Seguidament, els fil·lopodis seran envaïts pels microtúbuls i d'aquesta manera creixen les

ramificacions axonals (Fig9). Aquesta segona modalitat permet a la neurona expandir la seva àrea presinàptica i incrementar les connexions dins la xarxa neural (Lewis et al., 2013).

3.2. Transport de membrana i creixement.

Quan un axó creix, cal que s'aporti i s'incorpori nova membrana al conus de creixement i a les noves ramificacions. Aquesta incorporació es dona a través de la fusió de vesícules a la membrana plasmàtica per un procés anomenat exocitosi.

Les neurones formen diferents tipus de vesícules. Una d'elles són les vesícules precursors del plasmalemma (PPVs) que es caracteritzen per ser vesícules grans (uns 150 nanòmetres (nm) de diàmetre), que s'alliberen per exocitosi a través de la via secretora. Les vesícules que s'alliberen per aquesta via van de l'aparell de Golgi fins a la membrana plasmàtica conduïdes a través dels filaments d'actina per la miosina1b (Almeida et al., 2011). Les PPVs només s'identifiquen per la seva morfologia però s'han observat en els conus de neurones en creixement o que estan regenerant i són les responsables de l'expansió de la membrana. Aquest mecanisme que té la neurona per créixer es dona a través de l'exocitosi regulada per factors de creixement i per l'activació de vies de senyalització com la PI3K i Cdc42 i hi estan involucrades un grup de proteïnes anomenades SNARE (de l'anglès *soluble NSF-attachment proteins*) (Pfenninger, 2009)(Schelski and Bradke, 2017)(Nichols and Smith, 2019).

3.2.1. Les proteïnes SNARE.

La superfamília de les proteïnes SNARE està formada per més de 60 proteïnes, altament conservades entre diferents espècies. Hi ha tres famílies: les proteïnes de membrana associades a vesícules (VAMPs), les proteïnes associades a sinaptosomes (SNAPs) i les sintaxines (STXs), aquestes dues últimes associades a la membrana plasmàtica. Totes elles es caracteritzen per tenir el domini SNARE (d'uns 60-70 aminoàcids) conservat (Klopper et al., 2007). Les VAMPs i les STXs tenen un sol domini SNARE que connecta a través d'una regió d'unió amb un domini transmembrana que permet el seu ancoratge. Les SNAPs, en canvi, tenen dos dominis SNARE connectats per una regió d'unió i s'ancora a la membrana a través de múltiples cues palmitoïlades (Han et al., 2017)(Karmakar et al., 2019).

Al 1993 es va proposar la hipòtesi SNARE en la que s'explica com es produeix la fusió de membranes a través del complex SNARE (Sollner et al., 1993). Descriuen que la fusió de membranes es dona quan una SNARE associada a la membrana d'una vesícula (v-SNARE), com ho són les VAMPs, contacta amb la seva SNARE diana (t-SNARE), que serien les STXs i les SNAPs. Es forma el complex trans-SNARE que aproxima les dues membranes, permetent la seva fusió. Un cop fusionades les membranes, el complex canvia de conformació, passant a formar el complex cis-SNARE a la membrana diana. El complex SNARE s'uneix de forma transitòria a la SNAP soluble (α -SNAP) i a la NSF (de l'anglès *N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*), que hidrolitza ATP i provoca la disgregació del complex. A més proposen un altre proteïna reguladora del complex, la sinaptotagmina, que evita que es doni una fusió de membranes en absència de senyal (Sollner et al., 1993).

Algunes SNAREs es poden trobar tant en vesícules com en la membrana diana, és per això que actualment es classifiquen segons la seva estructura cristal·lina en Q-SNARE (la majoria actuen com a t-SNARE) i R-SNARE (la majoria actuen com a v-SNARE) (Hong and Lev, 2014).

El primer complex SNARE que es va descriure estava format per la STX1, SNAP-25 i VAMP2. Més endavant es va demostrar que els complexos SNARE variaven els seus components segons la seva funció i localització subcel·lular (**Fig.10**) (Hong and Lev, 2014)(Wang et al., 2017).

Les SNARE van ser identificades per la seva participació en l'alliberació de vesícules als terminals sinàptics. En aquest procés és clau que la fusió de les vesícules es doni ràpidament en el moment en que es rep la senyal de calci. Per a que això sigui possible, cal que les SNARE es concentrin a la mateixa zona i que proteïnes reguladores impedeixin la fusió espontània. Recentment s'ha proposat que els complexos SNARE es localitzen en anells hexamèrics, juntament amb les proteïnes reguladores Munc13, Munc18, la sinaptotagmina i la complexina, que impedeixen la seva fusió espontània (Li et al., 2019). En el moment que es rep la senyal, la sinaptotagmina canvia la seva conformació, facilitant la fusió dels dominis SNARE de cada complex, de manera que es produeix una fusió radial (dels 6 complexos SNARE) que facilita l'obertura del porus de la membrana (**Fig.11**) (Rothman et al., 2017)(Han et al., 2017)(Rizo, 2018)(Li et al., 2019).

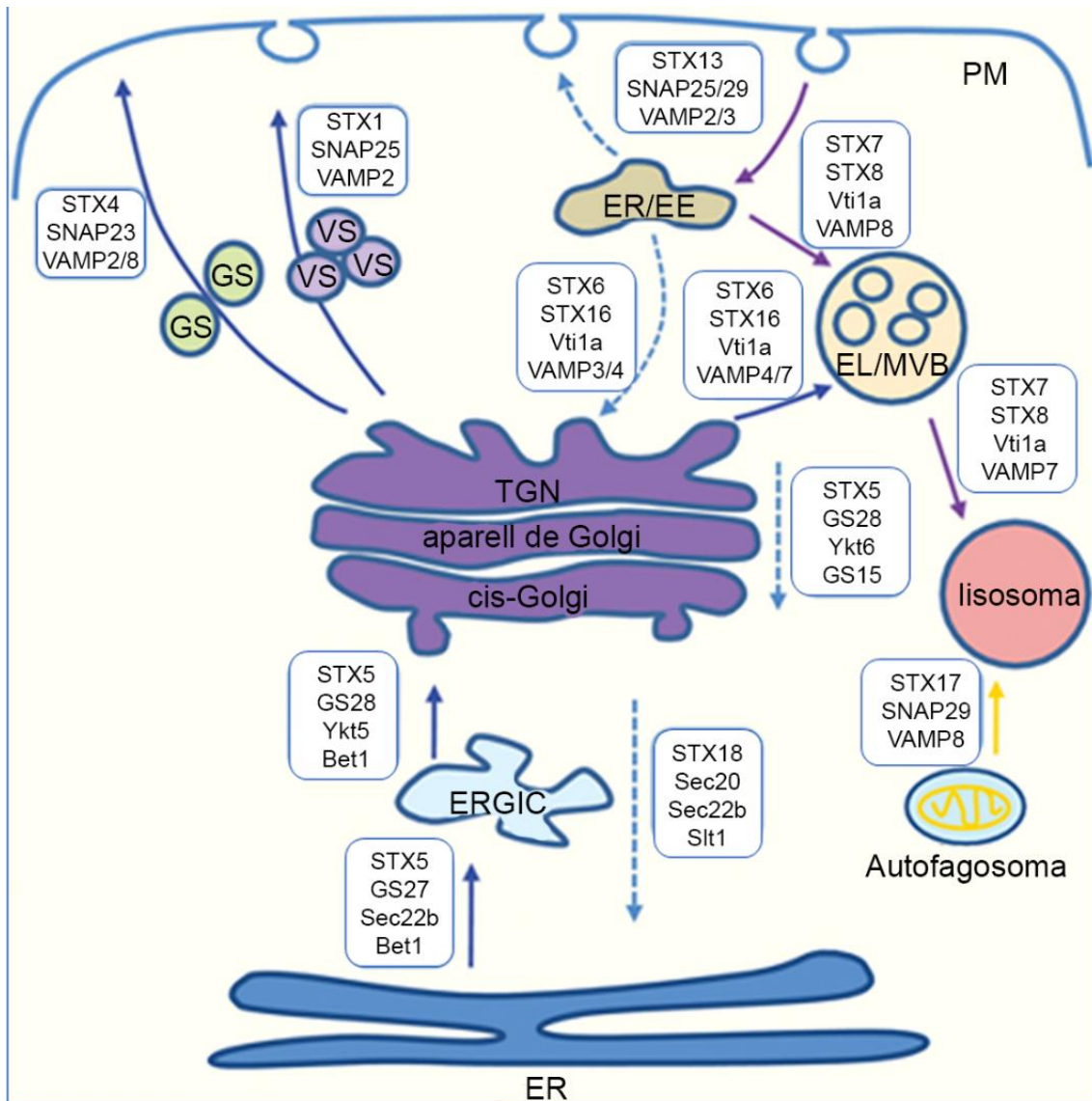


Fig10. Transport vesicular dependent de complexes SNARE. Esquema on es representen diferents complexes SNARE i les vies de transport en les que actuen. PM: membrana plasmàtica, ER: reticle endoplasmàtic, ERGIC: ER-compartiment intermedi de Golgi, GS: grànul secretori, VS: vesícula sinàptica, ER/EE: endosoma de reciclatge/endosoma primerenc, EL/MVB: endosoma tardà/cos multivesicular.

(imatge modificada de (Wang et al., 2017))

En els últims anys, hi ha estudis que han demostrat la relació entre la dinàmica del reciclatge de la membrana, la guia axonal i el creixement neurític (Chen et al., 2016)(Barrecheguren et al., 2017)(Zhang et al., 2017)(Fuschini et al., 2018). Els conus de creixement estan plens de vesícules que presenten proteïnes SNARE i altres components de la maquinària exocítica (Sabo and McAllister, 2003)(Yuan et al., 2003)(Condeelis et al., 2005)(Chernyshova et al., 2011)(Fujita et al., 2013). S'ha descrit que aquestes proteïnes participen en la quimoatracció i quimiorepulsió mitjançant processos d'exocitosis i endocitosis respectivament (Cotrufo et al., 2011)(Cotrufo et al., 2012)(Zylbersztein et al., 2012)(Ros et al., 2015).

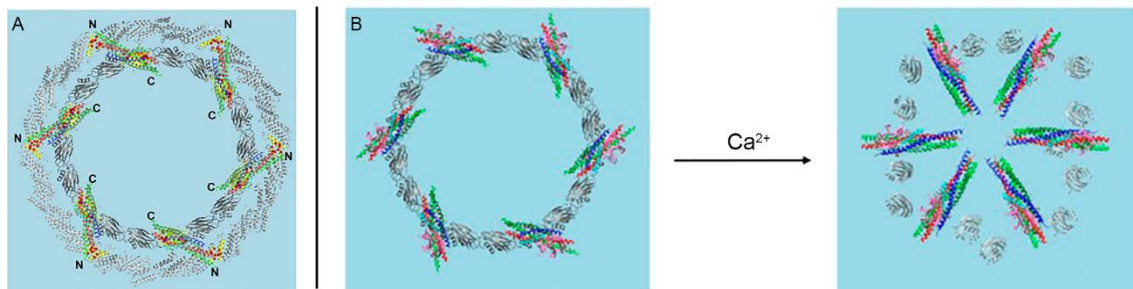


Fig11. Hipòtesi formació del complex SNARE. (A) Esquema on es representen els dos anells formats per 6 Munc13 (anell extern) i 18 sinaptotagmines (anell intern), on es col·loquen 6 complexos SNARE orientats amb l'extrem c-terminal, on es troba el domini transmembrana, cap a l'anell interior. (B) Esquema on es representen els complexos SNARE sobre l'anell de sinaptotagmina. Al rebre la senyal de calci, les molècules de sinaptotagmina roten, l'anell es trenca i els complexos SNARE es fusionen amb la membrana en una disposició radial que afavoreix la formació del porus.

(imatge modificada de (Rothman et al., 2017))

Per exemple, s'ha descrit que VAMP2 és necessària per la quimioatracció per L1 (Tojima et al., 2007) i per la repulsió davant de Sema3A (Zylbersztejn et al., 2012), que la v-SNARE ti-VAMP (de l'anglès *tetanus neurotoxin insensitive VAMP*) i la t-SNARE SNAP25 són necessàries pel creixement neurític (Osen-Sand et al., 1993)(Martinez-Arca et al., 2000)(Meldolesi, 2011) i que la Sintaxina-1 (STX1) és necessària per l'atracció davant de Netrina-1 (Cotrufo et al., 2011)(Cotrufo et al., 2012).

Per una altra banda, també s'han relacionat les proteïnes SNARE, com la STX13, amb processos de regeneració neural ja que quan es lesiona un axó, cal un tràfic vesicular de l'axó cap al soma i a l'inrevés, i també l'aportació de nova membrana per generar un nou conus de creixement (Tuck and Cavalli, 2010)(Bloom and Morgan, 2011)(Cho et al., 2014)(Chen et al., 2016).

El procés oposat a l'exocitosi és l'endocitosi, mitjançant el qual les cèl·lules recuperen components de la membrana i del medi extracel·lular. Existeixen diferents rutes endocítiques que es poden produir en paral·lel i que tenen funcions diferents (Hinze and Boucrot, 2018): l'endocitosi dependent de clatrina, que forma petites vesícules recobertes de monòmers de clatrina que participen en el reciclatge dels receptors de membrana; l'endocitosi dependent de caveolina que es caracteritza per ser zones de membrana riques en colesterol que invaginen la superfície; l'endocitosi ultraràpida (FEME) que es produeix a les sinapsis i necessita de les proteïnes endofilina, dinamina i el citoesquelet d'actina; i la macropinocitosi, on es formen vacuoles més grans degut a la invaginació de la membrana orquestrada pel citoesquelet d'actina. Durant el desenvolupament i guia

axonal, moltes senyals extracel·lulars produeixen el col·lapse del conus a través de la macropinocitosi (com Sema3A) o per endocitosi dependent de clatrina (com Slit2 o les Efrines) (Hansen and Nichols, 2009)(Tojima and Kamiguchi, 2015)(Hinze and Boucrot, 2018).

L'endocitosi i l'exocitosi dins del conus de creixement es poden donar de forma simètrica o asimètrica. Quan es donen de forma simètrica, la conseqüència és el col·lapse del conus i retracció de l'axó (amb l'endocitosi) o l'expansió del conus i l'increment del creixement (amb l'exocitosi). Però si les senyals que indueixen aquests dos processos venen en forma de gradient, produeixen que l'exocitosi o l'endocitosi es doni asimètricament al conus i el que es donarà és un gir de l'axó. En el cas que el gradient sigui d'una senyal atractiva, s'incrementarà l'exocitosi cap al mateix costat de la senyal, incrementant la superfície de membrana i girant cap aquella direcció. En el cas que la senyal sigui repulsiva, el que es produirà és endocitosi i l'efecte serà just al contrari (Tojima and Kamiguchi, 2015).

3.2.1.2. La Sintaxina-1 (STX1).

La STX1 forma part de la superfamília de les STX. Les STX són proteïnes t-SNARE localitzades a la membrana plasmàtica que estan formades per tres dominis: un domini transmembrana a l'extrem C-terminal, un domini SNARE i un domini regulador (Habc) a l'extrem N-terminal (Hong and Lev, 2014). La STX1 té una proteïna reguladora, Munc18 que participa en la formació del complex SNARE (Rothman et al., 2017). En gran part dels vertebrats trobem dues isoformes, codificades per dos gens diferents, que presenten el 84% d'homologia: la Sintaxina-1A (STX1A) i la Sintaxina-1B (STX1B). Les dues isoformes s'expressen en gran part dels teixits i especialment al SN. La majoria de neurones expressen ambdues isoformes i es creu que tenen funcions molt similars, formant part del complex SNARE amb SNAP25 i VAMP2 i participant en processos d'exocitosis (Hong and Lev, 2014)(Rothman et al., 2017)(Li et al., 2019).

Els gens de les proteïnes STX1A i STX1B es troben a l'ancestre comú dels organismes eucariotes. Mentre que el gen de la STX1A s'ha conservat en multitud d'espècies dins dels primats, rosegadors, mamífers placentaris, aus, rèptils, peixos i invertebrats; la STX1B s'ha perdut en algunes espècies d'invertebrats, com *Drosophila melanogaster*, i de vertebrats, com el porc (*Sus scrofa domestica*) o el pollastre (*Gallus gallus domesticus*) (Bennett et al.,

1992)(Teng et al., 2001). La pèrdua de la STX1B en aquests organismes facilita l'estudi del paper d'aquesta proteïna durant el desenvolupament d'aquests models animals.

En canvi, investigar la STX1 en ratolí resulta més complexa per dues raons: els efectes compensatoris mutus que exerceixen les isoformes, i que l'eliminació conjunta de les dues isoformes és letal en edat embrionària (E18) (Mishima et al., 2014). En estudis fets *in vitro*, s'ha demostrat que la STX1 es necessària tant per la viabilitat de les neurones (Kofuji et al., 2014), per la fusió de vesícules sinàptiques durant la comunicació neural (Vardar et al., 2016), per processos de guia axonal com la quimioatracció i l'exocitosi davant de Netrina-1 (Cotrufo et al., 2011)(Cotrufo et al., 2012), i el creixement neurític a través dels receptors de neurotrofines amb activitat tirosina quinasa (Trk) (Fuschini et al., 2018). També s'ha vist que l'expansió de la membrana durant el creixement neurític degut a la incorporació de lípids provinents del reticle endoplasmàtic necessita la presència de STX1 (Arantes and Andrews, 2006)(Petkovic et al., 2014).

Mentre que el ratolí mutant knockout (KO) per STX1A es totalment viable i té un desenvolupament normal, el KO per STX1B no sobreviu a partir de P14 (Kofuji et al., 2014). Els estudis fets *in vivo* mostren que els ratolins KO per STX1A tenen un cervell amb estructura normal i només presenten defectes cognitius lleus (Fujiwara et al., 2006) i anomalies de comportament (Fujiwara et al., 2016) relacionades amb característiques típiques d'autisme (Kofuji et al., 2017). Pels ratolins KO per STX1B s'han descrit defectes en la transmissió sinàptica i la supervivència neuronal (Mishima et al., 2014)(Wu et al., 2015)(Fujiwara et al., 2017) que es tradueixen en la supervivència de l'animal en estadis de vida primerencs.

S'ha demostrat la importància de STX1 en altres models animals com el pollastre o *Drosophila melanogaster* (ambdós models només expressen STX1A) on s'ha vist que pèrdues de funció d'aquesta proteïna porta a defectes motors de l'axó (Barrecheguren et al., 2017). En pollastre, la STX1A és necessària per la correcta direccionalitat dels axons de les neurones comissurals de la zona dorsal de la medulla espinal (Cotrufo et al., 2011). En el cas de *Drosophila*, quan la STX1A presenta mutacions en homozigosi comporta la mort embrionària. Aquesta proteïna participa en la transmissió sinàptica (Bademosi et al., 2017) i la dinàmica de les membranes durant el desenvolupament, però al contrari que en vertebrats, encara no s'ha vist una implicació directa amb guia axonal.

Capítol 4: Microdominis de membrana

Lipid Rafts.

La membrana plasmàtica no és una bicapa lipídica homogènia i estàtica. Sabem que la membrana és una estructura dinàmica i heterogènia on existeixen microdominis amb una composició lipídica particular, rica en colesterol i esfingolípid, que s'anomenen *lipid rafts*.

Els lípids representen entre el 50 i el 60% del pes sec del SN. Al cervell trobem diferents classes de lípids, més o menys en proporcions similars, agrupats en esfingolípid, glicerofosfolípids (GSL) i colesterol. Qualsevol canvi en el metabolisme lipídic pot alterar la composició de la membrana i, això, pot relacionar-se amb malalties neurològiques on es dona una degeneració progressiva de les neurones com en el cas de l'Alzheimer, el Parkinson, el Huntington, l'esquizofrènia, l'epilèpsia i el trastorn bipolar (Hussain et al., 2019)(Casares et al., 2019).

4.1. Composició i estructura.

En els primers estudis fets sobre els *lipid rafts*, aquests es van descriure com a microdominis de membrana, rics en colesterol i esfingolípid, on es reclutaven proteïnes de membrana ancorades amb un domini GPI (de *glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein*) i que servien com a plataformes de senyalització (Harder and Simons, 1997).

El cervell es considera un òrgan ric en colesterol ja que conté el 25% del colesterol de tot el cos i el 80% d'aquest es troba formant part de la mielina. Aquest lípid es sintetitza activament al SNC durant les primeres setmanes de vida. Les neurones només poden sintetitzar una petita quantitat de colesterol, de manera que la majoria de colesterol que incorporen a les seves membranes és sintetitzat pels astròcits i transportat a través de lipoproteïnes fins a les neurones. Cal tenir present que el colesterol del SNC ha de ser sintetitzat localment, ja que la barrera hematoencefàlica no permet el seu pas. En el sistema nerviós perifèric (SNP), el colesterol és sintetitzat per les cèl·lules de Schwann i només amb la seva activitat ja és suficient per mielinitzar un axó. El colesterol

proporciona gruix, rigidesa i ordre a les membranes i pot reclutar multitud de proteïnes (Hussain et al., 2019).

L'altre classe de lípid que trobem formant part dels *lipid rafts* són els esfingolípid. Existeixen una gran varietat d'esfingolípid i tots ells són vitals per formar l'estructura de les membranes i per regular senyalitzacions cel·lulars. A més, participen en la diferenciació neuronal, la transmissió sinàptica en les connexions entre neurones i glia, i estan associats a l'estabilitat de la mielina (Olsen and Faergeman, 2017)(Hussain et al., 2019).

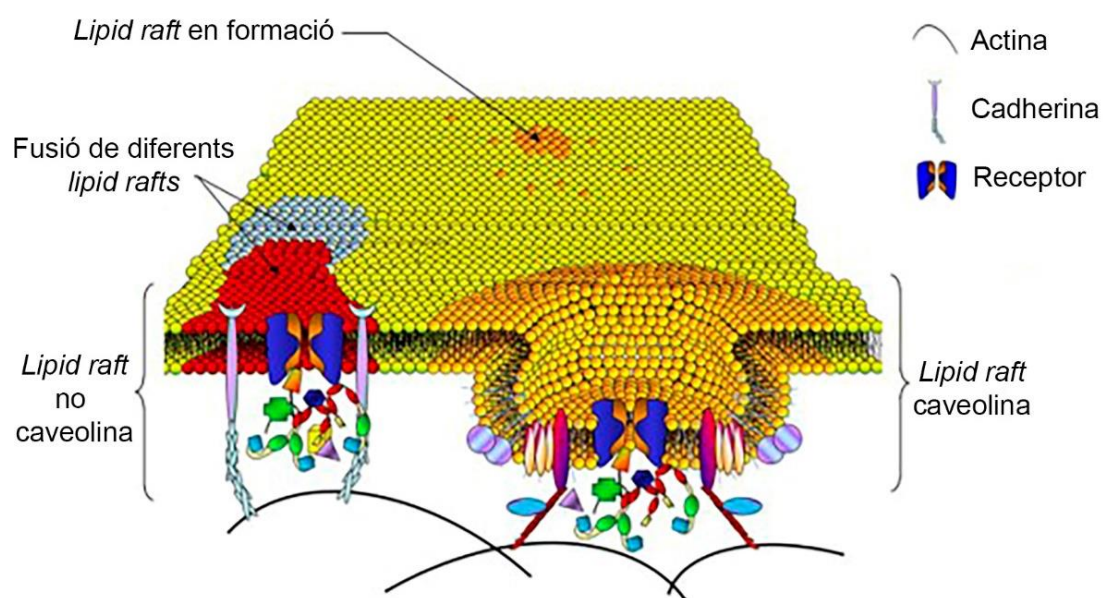


Fig12. Estructura convencional dels lipid rafts. Esquema que mostra els dos tipus de *lipid rafts* convencionals (amb caveolina o sense) i les molècules que el formen.

(imatge modificada de (Maguy, Hebert, and Nattel 2006))

Inicialment, es van identificar dos grans tipus de *lipid rafts*, els que tenien caveolina i formaven invaginacions, i els que no (Fig12). Els van distingir per ser dominis de membrana resistents als tractaments amb detergents (DRM, de l'anglès *detergent resistance membrane*) i per marcar-se amb molècules com la toxina colèrica, que s'uneix al gangliòsid GM1 (de l'anglès *monosialotetrahexosylganglioside 1*) present a *lipid rafts* (Harder and Simons, 1997)(Maguy et al., 2006).

En els últims anys, gràcies als avenços en tècniques de microscòpia i l'aïllament de molècules com lípids i proteïnes, la idea que teníem de *lipid rafts* ha evolucionat molt.

4.2. Dinàmica i regulació.

Avui en dia se sap que els *lipid rafts* poden variar molt depenent del tipus cel·lular on es trobin. Actualment se sap que els *lipid rafts* passen per diferents estats on canvien de mida, de dinàmica i de composició. Aquests tres paràmetres es poden veure afectats per processos com el tràfic de membrana i l'activació de vies de senyalització (Simons and Sampaio, 2011)(Sezgin et al., 2014)(Sezgin et al., 2017).

La regulació de la formació dels microdominis de membrana es dona per interaccions. Una d'elles es la interacció lípid-lípid que es dona entre el colesterol i els esfingolípid gràcies a la formació de ponts d'hidrogen. També trobem altres lípids que interactuen amb el colesterol, com els gangliòsids i fosfolípids saturats. Aquesta preferència entre els esfingolípid i els esterols es deu a la saturació de les cues hidrofòbiques dels esfingolípid i als ponts d'hidrogen que es formen entre aquests lípids. Totes aquestes molècules de caràcter hidrofòbic proporcionen a aquestes regions un increment en la compactació dels lípids, és a dir, més ordre i menys fluïdesa (Simons and Sampaio, 2011)(Sezgin et al., 2014). Aquests microdominis són petits, heterogenis i dinàmics i es poden trobar de forma asimètrica tant a la cara interna com externa de la membrana cel·lular, formant plataformes claus per la transducció de senyals i la regulació de processos cel·lulars degut a que s'hi localitzen tant receptors extracel·lulars, com intermediaris de senyalització intracel·lulars tals com petites GTPases, quinases com les Src o lípids que actuen com a segons missatgers (Head et al., 2014). El colesterol es troba per tota la membrana, però preferentment es localitza en els dominis més ordenats (Tsui-Pierchala et al., 2002)(Sezgin et al., 2017). Un altre tipus d'interacció que regula els *lipid rafts* és la interacció lípid-proteïna, degut a que algunes proteïnes tenen dominis d'unió al colesterol o als esfingolípid. També hi ha proteïnes que tenen modificacions com cues palmitoil o GPI, que els hi donen preferència per a localitzar-se als *lipid rafts*, o bé elles mateixes poden reclutar aquests microdominis quan es troben formant part de complexes proteics més grans. Una altre forma de regular la formació de *lipid rafts* és per la llargada dels dominis transmembrana de les proteïnes. Les proteïnes amb dominis transmembrana llargs tenen preferència per localitzar-se als *lipid rafts* degut a que els lípids saturats tenen cadenes més llargues i per tant la membrana en aquella regió és més gruixuda i el domini proteic queda més protegit (Simons and Gerl, 2010). Per últim, el citoesquelet d'actina també

participa en la regulació, ja que pot ancorar-se a través d'adaptadors a les cadenes saturades de la capa interna de la membrana. Aquest ancoratge immobilitza transitòriament el microdomini de la capa interna i les cadenes saturades recluten colesterol i altres cadenes saturades de la capa externa, formant així un *lipid raft* a la bicapa, el qual serà dinàmic degut a la interacció amb el citoesquelet d'actina. El mecanisme molecular pel qual l'actina regula la formació dels *lipid rafts* encara no es comprèn del tot i calen més estudis per entendre com aquests nanoclústers poden formar dominis funcionals més grans (Sezgin et al., 2017).

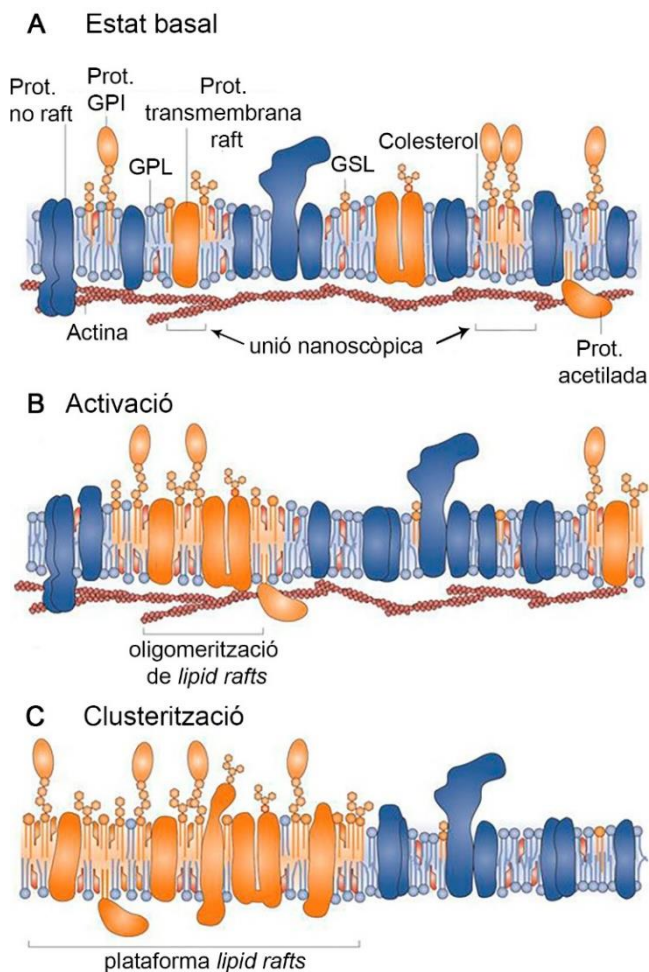


Fig13. Heterogeneïtat dels *lipid rafts*. Esquema on es mostren els diferents estats com es poden trobar els *lipid rafts*. Un estat basal (A) on trobem proteïnes GPI-ancorades, proteïnes acetilades a la cua citoplasmàtica i proteïnes transmembrana associades a rafts que formen part dels *lipid rafts* nanoscòpics juntament amb el colesterol, glicerofosfolípids (GPL) i glicoesfingolípid (GSL). Després d'un senyal extra- o intracel·lular es produeix l'activació (B) i oligomerització dels rafts i l'última fase de clusterització (C).

(imatge modificada de (Simons and Gerl 2010))

En un estat basal, els *lipid rafts* són nanoscòpics (entre 20 i 200 nm), indetectables pels marcadors convencionals com GM1 o DRM, i s'hi troben proteïnes GPI-ancorades, proteïnes doble-acetilades a la cua citosòlica, proteïnes ancorades a glicoesfingolípid i altres proteïnes transmembrana associades a *lipid rafts* (Fig13.A). Quan hi ha un senyal extern o intern, els *lipid rafts* oligomeritzen entre ells amb interaccions lípid-lípid, lípid-proteïna o proteïna-proteïna i es tornen més estables (Fig13.B). En aquest estat podem trobar diferents famílies de proteïnes en un mateix *lipid raft*. La mida d'aquests microdominis segueix estant per sota de la resolució òptica dels microscopis actuals, però són funcionals i ja poden

actuar com a plataformes de senyalització. L'últim estat és el de clusterització (Fig13.C), en el que els *lipid rafts* ja formen dominis molt més grans (> 300 nm), detectables amb microscopi i amb els marcadors convencionals. Es dona quan els receptors s'activen, es fosforilen i incrementen les interaccions entre proteïnes (Simons and Gerl, 2010)(Simons and Sampaio, 2011)(Sezgin et al., 2017).

4.3. Mecanismes d'estudi dels *lipid rafts*.

Un factor que complica l'estudi de les proteïnes que estan localitzades a *lipid rafts* és el mètode per mitjà del qual s'aïllen o es reconeixen els microdominis lipídics.

Les tècniques disponibles per detectar-los han evolucionat molt, i gràcies a això també ho ha fet la forma que tenim avui d'entendre la composició i funcionalitat d'aquests microdominis. El principal inconvenient és que les tècniques actuals presenten limitacions per a l'estudi de cèl·lules vives, i al ser estructures tan dinàmiques perdem gran part de la informació.

La primera tècnica que es va utilitzar per a aïllar *lipid rafts* i les proteïnes que s'hi trobaven localitzades va ser separar diferents fraccions de membrana mitjançant gradients de sacarosa segons la seva resistència a detergents. D'aquesta manera s'obtenien dues fraccions, la soluble i la DRM i és en aquesta última on es troben el colesterol, els esfingolípids i les proteïnes associades a *lipid rafts*. El principal inconvenient d'aquesta tècnica és que l'extracció amb detergent elimina part dels lípids i proteïnes que es troben als *lipid rafts* i per tant es perd informació (Levental et al., 2009)(Komura et al., 2016).

Una altre tècnica d'estudi és la formació de membranes artificials. Aprofitant les diferents propietats biofísiques de les membranes es poden formar vesícules unilamel·lars gegants (GUVs de l'anglès *giant unilamellar vesicles*) i vesícules gegants derivades de cèl·lules (GPMVs de l'anglès *cell-derived giant plasma membrane vesicles*) que permeten separar dues fases de membrana diferents: desordenada i ordenada, on es troben els *lipid rafts* (Kaiser et al., 2009)(Sezgin and Schwille, 2012)(Sezgin et al., 2015).

Existeixen marcadors per detectar components dels *lipid rafts* com la toxina colèrica, que s'uneix al GM1, o la filipina, que s'uneix al colesterol. Tal i com s'ha comentat anteriorment, la mida dels *lipid rafts* és molt variable i quan són inferiors a 250 nm no poden ser detectats pels microscopis òptics convencionals però si que és possible fer-ho

amb microscopis de super-resolució (Sezgin and Schwille, 2011). L'estudi de la dinàmica d'una proteïna localitzada en microdominis nanoscòpics mitjançant microscòpia de super-resolució es pot fer amb la tècnica del SPT (de l'anglès *single particle tracking*), i segons el seu comportament de difusió per la membrana es pot concloure si es localitza o no a *lipid rafts* (Suzuki, 2016)(Sezgin et al., 2017). Tots aquest mecanismes necessiten de marcadors fluorescents que poden afectar a la composició de la membrana i, per tant, dels *lipid rafts*. Per evitar aquest inconvenient, es poden utilitzar altres mètodes com l'espectrometria de masses i la microscòpia electrònica (Sezgin et al., 2017).

Una altre forma d'estudiar la composició de la membrana es a través de probes quantitatives que mesuren el nivell d'hidratació d'aquesta, com és el cas del Laurdan. Aquest reactiu és capaç de detectar l'ordre dels lípids que formen la bicapa lipídica (Sezgin et al., 2014).

Un últim mètode consistiria en utilitzar drogues que ataquin diferents components dels *lipid rafts* amb l'objectiu de disgregar-los i que les proteïnes que s'hi localitzen perdin la seva funcionalitat. Exemples d'aquestes drogues serien la metil- β -ciclodextrina (M β CD), les estatines i la colesterol oxidasa (ChOx), que treuen específicament el colesterol de les membranes, o les esfingomielinases, que eliminen els esfingolípid (Tsui-Pierchala et al., 2002)(Sezgin et al., 2017).

4.4. Funcions fisiològiques dels *lipid rafts* durant el desenvolupament del SN.

Els *lipid rafts* estan involucrats en diverses funcions cel·lulars com: el tràfic vesicular de lípids i proteïnes a la membrana plasmàtica, processos d'endocitosis i exocitosis, la transducció de senyals a través de receptors de membrana, la regulació del citoesquelet reclutant molècules com les Rho GTPases i el fosfatidilinositol fosfat (PIP), l'adhesió cel·lular a l'ECM a través de molècules d'adhesió, la guia axonal, el creixement i regeneració neural, la transmissió sinàptica i la inducció de mort cel·lular (Tsui-Pierchala et al., 2002)(Guirland and Zheng, 2007).

4.4.1. Lipid rafts i guia axonal.

Durant la guia axonal els axons han de girar i estendre's cap a una direcció o una altre segons el gradient de senyal que estiguin rebent. Això implica que la senyalització ha de ser asimètrica, és a dir, que els receptors activats han d'estar localitzats a una zona concreta de la membrana, activar localment la via de senyalització i fer els canvis al citoesquelet en aquella zona.

Els *lipid rafts* estan involucrats en generar aquesta asimetria. La unió del lligand als seus receptors provoca que aquests oligomeritzin i es localitzin tots en una mateixa plataforma de *lipid rafts*, s'amplifiqui la senyal i interaccionin amb altres proteïnes que es troben en aquests microdominis i excloguin les no *rafts*, que podrien estar actuant com a inhibidors de la senyal. D'aquesta manera, tota l'activació es dona en un punt concret de la membrana del conus de creixement, i permet el gir de l'axó (Guirland and Zheng, 2007).

Entre els receptors que es troben a *lipid rafts* trobem alguns que participen en la guia axonal. S'ha descrit que el receptor de BDNF (TrkB), el receptor de Netrina-1 (DCC), els de les Efrines A i B i el receptor de Sema3A (Neuropilina-1) estan localitzats a *lipid rafts* i que quan aquests es disgreguen amb M β CD, molt utilitzada per extreure el colesterol de les membranes, els receptors deixen de ser funcionals i els axons no responen ni a l'atracció ni a la repulsió d'aquestes molècules guia (Guirland et al., 2004)(Guirland and Zheng, 2007)(Kamiguchi, 2006)(Funfschilling et al., 2012)(Averaimo et al., 2016)(Kao et al., 2017).

També s'ha postulat que el citoesquelet podria estar involucrat en la posició i estabilitat dels *lipid rafts* i en l'associació de diverses molècules a aquestes plataformes, proporcionant així l'asimetria a la membrana (Golub et al., 2004).

4.4.2. Lipid rafts, creixement i regeneració neural.

Hi ha moltes discrepàncies sobre el paper que tenen el colesterol i els microdominis de membrana en el creixement de les neurites. Mentre hi ha estudis que recolzen la idea que els *lipid rafts* són necessaris pel creixement i la regeneració neural, altres proposen la seva eliminació com a possible diana per promoure ambdós processos.

Tal i com he comentat anteriorment, els *lipid rafts* estan vinculats al citoesquelet d'actina. Hi ha discrepàncies si és el citoesquelet el que actua sobre la localització dels *lipid rafts*,

o si són aquests els que actuen sobre la reorganització dels filaments d'actina. El que sí que està clar és que proteïnes reguladores de l'actina, com les Rho GTPases, el fosfatidilinositol bifosfat (PIP2), les WASP; receptors d'adhesió a la ECM, claus per ancorar-se al substrat i permetre el creixement de l'axó, com les CAM, TAG-1 (de l'anglès *transiently expressed axonal glycoprotein-1*) integrines i cadherines, estan localitzats en aquests microdominis (Li et al., 2017a)(Kalappurakkal et al., 2019).

Molts dels receptors amb activitat tirosina-quinasa es localitzen a *lipid rafts*. Entre ells trobem els receptors Trk de neurotrofines com la NGF, el EGFR (de l'anglès *epidermal growth factor receptor*), el PDGFR (de l'anglès *platelet-derived growth factor receptor*) i el receptor d'insulina (Pryor et al., 2012) (Fukuda et al., 2015)(Seong et al., 2017)(Yamamoto et al., 2019). Altres receptors necessiten translocar-se a *lipid rafts* un cop s'han unit amb el seu lligand. Un exemple és el complex de receptors del GDNF (de l'anglès *glial cell-derived neurotrophic factor*) que un cop s'uneix al seu receptor GFR α (de l'anglès *growth factor receptor alpha*), que es localitza a *lipid rafts*, recluta per mitjà del citoesquelet d'actina al segon receptor, Ret, i aquest activa la transducció de senyal (Li et al., 2017b). Tots aquests receptors promouen el creixement, la proliferació, la diferenciació i la supervivència (Paratcha et al., 2001)(Tsui-Pierchala et al., 2002)(Fukuda et al., 2015)(Kao et al., 2017). També s'ha demostrat que els *lipid rafts* actuen com a plataformes d'activació de la senyalització d'Akt, promovent la ramificació i expansió del conus (Grider et al., 2009)(George and Wu, 2012)(Mattei et al., 2015)(Ohtsuka et al., 2017)(Sural-Fehr et al., 2019).

Si només tenim present el vincle dels *lipid rafts* amb el citoesquelet d'actina i els receptors de neurotrofines i de molècules atractives, podríem concloure que els *lipid rafts* són necessaris pel creixement neurític.

Cal tenir en compte, però, que receptors de molècules de guia axonal que provoquen repulsió i inhibició del creixement com el receptor de Sema3A (neuropilina-1) i els receptors de les Efrines A i B, o la Neogenina, que és el receptor de RGMa (de l'anglès *repulsive guidance molecule BMP co-receptor A*), estan a *lipid rafts*. A més, algunes glicoproteïnes associades a la mielina (MAG, de l'anglès *myelin associated glycoprotein*) com Nogo, que inhibeix el creixement, té els seus receptors NgR (de l'anglès *Nogo receptor*) i p75NTR (de l'anglès *neurotrophin receptor p75*) als *lipid rafts*. S'ha proposat que una bona estratègia per promoure el creixement axonal consistiria en disminuir el

colesterol de les membranes, amb M β CD per exemple, i així aquests perdrien la seva funcionalitat, i l'axó podria créixer més fàcilment (Chilton, 2006)(Shelly et al., 2011)(Funfschilling et al., 2012)(Tassew et al., 2014)(Averaimo et al., 2016). S'ha demostrat que els nivells de colesterol de les membranes varien molt d'un tipus neuronal a un altre. Tenint en compte que els nivells de colesterol han d'estar sempre dins d'un equilibri que permeti la viabilitat de la cèl·lula, un mateix tractament per disminuir el colesterol pot tenir efectes molt diferents segons el tipus cel·lular. Per exemple, les neurones d'hipocamp tenen més colesterol que les corticals, i quan es tracten els dos tipus cel·lulars amb una dosi baixa de M β CD, les neurones d'hipocamp incrementen el creixement de les neurites mentre que les corticals no (Ko et al., 2005).

Hi ha pocs estudis sobre el paper dels *lipid rafts* en regeneració neural. Recentment s'ha demostrat que després d'eliminar el colesterol amb M β CD s'incrementa la regeneració del nervi òptic i de la medul·la espinal de pollastre degut a la pèrdua de funció del receptor Neogenina. Aquest receptor es troba a *lipid rafts* i quan s'uneix a RGMa provoca inhibició del creixement axonal i mort cel·lular. Quan hi ha un traumatisme, l'expressió de RGMa incrementa al lloc de la lesió del SNC i aquesta via és una de les responsables de que els axons del SNC no puguin regenerar. Al impedir la localització de Neogenina als *lipid rafts*, aquesta deixa de ser funcional, i això provoca que sigui incapaç d'inhibir el creixement axonal i d'induir apoptosi i, per tant, el resultat és un augment del creixement i regeneració neural i de la supervivència cel·lular després d'una lesió (Tassew et al., 2014).

Capítol 5: Regeneració.

El SN es divideix en el SNC i el SNP. El SNC està format pel cervell i la medulla espinal i el SNP està format pels ganglis i els nervis que connecten el SNC amb la musculatura i els diferents òrgans. Les neurones del SNC adult es diferencien de les del SNC embrionari i les del SNP per la seva poca capacitat de regenerar després de patir una lesió. El primer pas que s'ha de fer per a una correcta regeneració és la formació d'un nou conus de creixement. Això implica multitud de processos entre els que destaquen la remodelació del citoesquelet, la mobilització de vesícules i l'aportació de nova membrana i proteïnes de membrana al final de l'axó malmès (Bradke et al., 2012).

5.1. La mielina.

La mielina es una estructura lipoproteica que envolta els axons i incrementa la velocitat dels impulsos nerviosos. Majoritàriament està composta per lípids (70-85%), sobretot colesterol, i una petita proporció correspon a proteïnes (15-30%). Mentre que la composició lipídica és similar entre el SNC i el SNP, la seva composició proteica varia degut, en part, a que la sintetitzen cèl·lules diferents: oligodendròcits en el SNC i cèl·lules de Schwann en el SNP. En ambdós casos conté proteïnes inhibidores del creixement axonal: en el cas del SNC, presenta la proteïna bàsica de la mielina (MBP, de l'anglès *myelin basic protein*), la PLP (de l'anglès *proteolipid protein*), MAG, Nogo, i la glicoproteïna OMGP (de l'anglès *oligodendrocyte-myelin glycoprotein*); i el SNP conté MBP, la glicoproteïna P₀, la PMP-22 (de l'anglès *peripheral myelin protein 22*) i MAG (Vargas and Barres, 2007). Així doncs, tant la mielina del SNC com la del SNP té la característica d'inhibir el creixement, tot i tenir composicions diferents.

5.2. Regeneració del SNC vs. SNP.

Quan es produeix una lesió i un axó es talla, el primer que es dona és la degeneració Walleriana, que és un procés altament regulat en el que es degrada part de l'axó lesionat. Primer es dona una entrada de calci a la cèl·lula que provoca una degeneració aguda d'uns centenars de micròmetres cap a la banda proximal de la lesió, i

una degeneració total de la part distal. Llavors el citoesquelet degenera i l'axó es fragmenta (Vargas and Barres, 2007)(Fawcett, 2019). Després de la lesió, el SNP pot formar un nou conus ràpidament i regenerar, mentre que el SNC és incapaç de fer-ho. Això es deu a factors intrínsecs de la pròpia cèl·lula (Erturk et al., 2007) i extrínsecs, com la presència de molècules inhibidores en l'entorn (Tan et al., 2005)(Li et al., 2013)(Duraikannu et al., 2019)(Fawcett, 2019).

5.2.1. Factors extrínsecs.

Quan hi ha una lesió al SNP es forma un nou conus de creixement que creix fins a la seva diana gràcies a un procés de guia axonal semblant al del desenvolupament embrionari, en el que participen les cèl·lules de Schwann que eliminen ràpidament la mielina fragmentada, recluten macròfags, secreten factors que promouen la regeneració, quimiotrofines i molècules d'adhesió, per facilitar que l'axó torni a innervar la seva diana (Allodi et al., 2012)(Duraikannu et al., 2019)(Fawcett, 2019). Davant d'una lesió, ja sigui per contusió o per seccionament, les cèl·lules de Schwann que envolten els axons es desdiferencien, comencen a inhibir l'expressió de gens relacionats amb la síntesi de mielina, de colesterol i de proteïnes com la P₀, la MBP o MAG i incrementen l'expressió de molècules d'adhesió i de neurotrofines com GDNF, BDNF, NGF i NT3 per tal de promoure el creixement de l'axó lesionat. Els macròfags són reclutats a la zona lesionada degut a l'alliberament de citoquines per part de les cèl·lules de Schwann i ambdós poblacions cel·lulars s'encarregaran de l'eliminació de les restes de mielina presents en l'ambient i que impedeix el creixement axonal (**Fig14**). Finalment, les cèl·lules de Schwann canvien de morfologia, s'alineen en columnes formant les bandes de Bungner, guiant a l'axó que està regenerant fins al seu teixit diana (Jessen and Mirsky, 2016).

El SNC no té la capacitat de formar un nou conus, sinó que forma bulbs col·lapsats que no permeten el creixement axonal. Els oligodendròcits no poden desdiferenciar-se com ho fan les cèl·lules de Schwann i són incapaços de remielinitzar. A més, es produeix un ambient pro-inflamatori al voltant de la zona lesionada que activa la microglia i els astròcits (glia reactiva). L'eliminació dels fragments de mielina depèn de la microglia, que no és tan efectiva com els macròfags i les cèl·lules de Schwann que actuen al SNP. Per tant, al SNC l'ambient queda ple de fragments de mielina que conté proteïnes inhibidores com MAG, Nogo i OMGP (**Fig14**). A més, cal afegir la presència de glia reactiva que formarà

la cicatriu glial prop de la lesió, formant una barrera física que impedirà el pas dels axons, i química, ja que la glia reactiva secreta inhibidors del creixement com els condroïtin-sulfats proteoglicans (CSPG), Semaforines, Efrines, Slits i Netrines (Giger et al., 2010)(Li et al., 2018)(Duncan et al., 2019).

S'ha demostrat que quan es cultiven neurones del SNC en un ambient lliure de molècules inhibidores, com les alliberades per la cicatriu glial, fragments de mielina i molècules repulsives, algunes d'aquestes neurones poden regenerar. Això demostra la importància dels factors extrínsecs en la regeneració axonal, principalment al SNC (Aguayo et al., 1981)(Case and Tessier-Lavigne, 2005)(Duraikannu et al., 2019)(Fawcett, 2019).

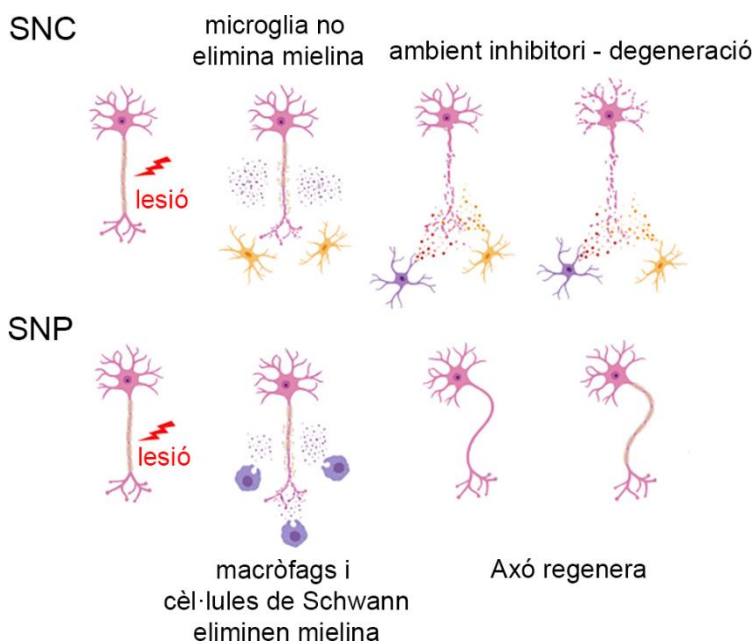


Fig14. Regeneració al SNC i al SNP. Esquema on es mostren les diferències entre la regeneració del SNC i el SNP. El SNC no pot regenerar degut a la incapacitat de la microglia d'eliminar les restes de mielina i a la secreció de molècules inhibidores per part de la glia reactiva, cosa que porta a la degeneració de la neurona. El SNP pot regenerar gràcies a la presència de macròfags que fagociten la mielina i a un ambient lliure de molècules inhibidores.

(imatge modificada de (Strittmatter and Fiske 2010))

5.2.2. Factors intrínsecs.

Les neurones del SNC i del SNP responen de forma diferent a una axotomia. Quan es produeix una lesió i l'axó es talla, entra una onada de calci a l'interior de la cèl·lula, que es propaga fins al soma. Aquesta onada actua com a senyal per activar diferents mecanismes: la despolimerització dels microtúbuls, el tràfic d'òrgànuls a través de l'axó, l'aportació de membrana i la síntesi de proteïnes. La resposta regenerativa depèn de l'expressió de gens associats a la regeneració (RAGs). Mentre que el SNP activa l'expressió d'aquests gens després d'una lesió, el SNC és incapaç de fer-ho (He and Jin, 2016)(Curcio and Bradke, 2018)(Fawcett, 2019). És el cas de les vies de senyalització com PI3K/Akt/mTOR (de

l'angles *mammalian target of rapamycin*); factors de transcripció com STAT3 (de l'anglès *signal transducer and activator of transcription 3*) i Sox11 o proteïnes com GAP-43 (de l'anglès *growth associated protein 43*), proteïnes d'adhesió i de transport, entre moltes altres, que promouen el creixement de les neurites i que s'expressen a nivells alts en el SNC embrionari i en el SNP, on encara s'incrementa més després d'una lesió. En el SNC adult, en canvi, els nivells d'expressió d'aquestes molècules són molt baixos (He and Jin, 2016)(Curcio and Bradke, 2018)(Fawcett, 2019).

En experiments fets *in vitro*, quan s'axotomitzen amb làser neurones corticals d'embrions de rata, prop del 70% regeneren, mentre que quan ho fan amb neurones d'adults només ho fan el 10%. Això suggereix que les neurones del SNC perden la seva capacitat intrínseca de regenerar que tenen durant el desenvolupament. En canvi, la majoria de DRG (de l'anglès *Dorsal Root Ganglion*) provinents d'adult poden formar un nou conus i regenerar després de patir una axotomia *in vitro* (Curcio and Bradke, 2018).

Els DRG són neurones bipolars que s'utilitzen molt com a model per estudiar la regeneració. Una de les seves projeccions innerva el SNP i l'altre el SNC i tenen capacitats regeneratives diferents, la primera regenera molt més però la segona també ho fa, tot i que amb menys eficàcia. El fet que la projecció que va cap a la medulla també regeneri es deu al que s'anomena la "lesió condicionant" (Senger et al., 2018).

Aquest mecanisme es basa en que una primera lesió activa un mecanisme de resposta d'activació dels RAGs que incrementa la síntesi i transport d'elements del citoesquelet. Això permet que davant d'una segona lesió es respongui més eficientment i es regeneri millor (Curcio and Bradke, 2018)(Senger et al., 2018)(Dubovy et al., 2019).

5.3. Mecanismes moleculars de la regeneració axonal.

Quan la membrana d'un axó es trenca, es desencadenen una sèrie de mecanismes que tenen un únic objectiu: formar un nou conus de creixement. L'eficàcia per formar-lo dependrà del tipus cel·lular, de l'edat de la neurona i de la presència de calci.

Tal i com he comentat anteriorment, el primer pas que es dona quan hi ha un trencament de membrana és l'entrada de calci a l'interior de la cèl·lula, que es desplaçarà com una onada fins al soma. Aquest calci és primordial per activar els següents mecanismes de

regeneració: la reparació de la membrana, la reorganització del citoesquelet, la síntesi de nova membrana i de proteïnes i l'activació dels gens RAGs. S'ha demostrat que quan no hi ha calci al medi extracel·lular, les neurones no poden regenerar (Bittner et al., 2016)(Blanquie and Bradke, 2018).

Just després de l'entrada de calci, el primer que ha de fer la neurona és reparar la membrana trencada per tal de recuperar l'homeòstasi i evitar la degeneració. Aquest procés consta de dos passos: primer es col·lapsa la membrana i després, gràcies a l'acció de les calpaïnes que degraden l'espectrina (proteïna que ancora el citoesquelet a la membrana plasmàtica), es redueix la tensió a la membrana i s'afavoreix la fusió de multitud de vesícules que s'hauran acumulat al lloc de la lesió (Fig15). Estudis recents demostren que tres proteïnes SNARE participen en la fusió d'aquestes vesícules: la STX, VAMP2 i la sinaptotagmina (Cho et al., 2014). La capacitat d'aportar nova membrana varia entre els diferents tipus neuronals, cosa que explicaria les diferències en la dificultat de regenerar (Bradke et al., 2012)(Blanquie and Bradke, 2018).

La principal diferència entre el SNC i el SNP es troba en la reorganització del citoesquelet de microtúbuls. Mentre que el SNP després d'una lesió manté els microtúbuls estables, semblants a un conus de creixement en desenvolupament, el SNC crea un bulb on els microtúbuls estan totalment desorganitzats. L'estabilitat dels microtúbuls és clau per a formar un nou conus de creixement i fer créixer l'axó. A més, el microtúbuls participen en el transport retrògrad de fragments del citoesquelet cap al nucli per tal d'activar els RAG i en el transport anterògrad d'òrgànuls, com les mitocòndries que són molt necessàries per aportar grans quantitats d'energia al lloc de la lesió, i de material, com actina i tubulina, a través de l'axó fins al lloc de la lesió (Erturk et al., 2007)(Bradke et al., 2012)(Curcio and Bradke, 2018). El citoesquelet d'actina també és important en la regeneració axonal. En neurones madures, el citoesquelet d'actina no sol ser molt dinàmic i per això sol fracassar en el seu intent de regenerar. Estudis recents han demostrat que l'ADF/cofilina promou la regeneració axonal en DRG i medul·la espinal després d'una lesió condicionant, gràcies a l'increment de la dinàmica del citoesquelet d'actina (Tedeschi et al., 2019).

Cal tenir present que les lesions sovint es donen lluny del soma. Això implica que la primera aportació de membrana i de proteïnes vingui donat per fonts ja existents a nivell

local i posteriorment es sintetitzen de nou al soma i siguin transportats fins a la part distal de l'axó. A l'axó trobem reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi, que aportaran lípids i proteïnes en un primer moment, a nivell local, però gran part de la síntesi de nou es dona al soma. Això implica que com més lluny es doni la lesió del soma i com més llarg sigui l'axó, més energia caldrà per poder regenerar (Bradke et al., 2012)(He and Jin, 2016)(Curcio and Bradke, 2018).

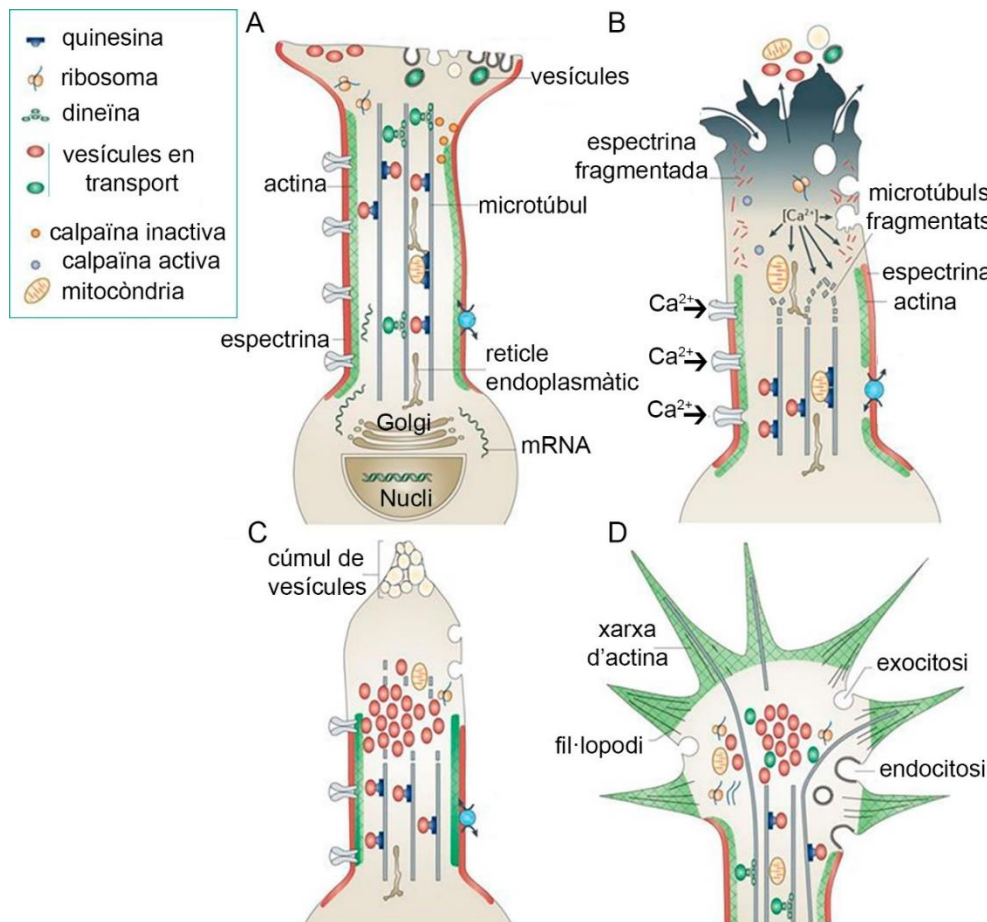


Fig15. Transformació d'un axó tallat en un nou conus de creixement. Esquema que representa els principals mecanismes que es desencadenen després d'una axotomia. (A) Axó en situació normal, amb un transport vesicular i citoesquelet normal. (B) Trencament de la membrana que provoca l'entrada de calci que causarà la despolimerització de l'actina i microtúbuls, el col·lapse de la membrana i l'activació de calpaïnes (que degradaran l'espectrina). (C) Les vesícules fusionen amb la membrana trencada i es restableix l'homeòstasi. S'activa la polimerització d'actina i tubulina. (D) Es forma un nou conus de creixement, amb la seva estructura típica, amb fil·lopodis, lamel·lipodis i microtúbuls al domini central.

(imatge modificada de (Bradke, Fawcett, and Spira 2012))

5.4. Via de senyalització PI3K/Akt.

Una de les vies de senyalització involucrades en la supervivència cel·lular, la formació de fil·lopodis i del conus de creixement, la morfogènesis de les dendrites, la polaritat de la neurona, la formació de sinapsis i espines, la plasticitat neural i l'establiment i creixement de l'axó, és la via de la PI3K/Akt (**Fig16**) (Henle et al., 2011)(Kakumoto and Nakata, 2013)(Berry et al., 2016)(Jin et al., 2018)(Curcio and Bradke, 2018).

Quan un estímul extern com les neurotrofines, les molècules de guia axonal, els factors de creixement o els components de l'ECM s'uneixen al seu receptor amb activitat tirosina quinasa, aquest fosforila la proteïna PI3K que al seu torn fosforila el PIP2 i el transforma en PIP3. A part, la PI3K també pot ser activada a través de Ras. Akt té un domini homòleg a la plecstrina (PH) que presenta molta afinitat per PIP3. Quan Akt està inactiu, aquest domini PH no és accessible i no pot unir-se a PIP3, de manera que Akt es troba al citosol, però quan és fosforilat per la PI3K, canvia de conformació i el domini PH pot unir-se a PIP3, de manera que Akt es situa a la membrana on podrà ser doblement fosforilada per ser totalment activa. La primera fosforilació, necessària per l'activitat d'Akt, es dona al residu treonina 308 (Thr308) per la quinasa 1 dependent de fosfoinosítid (PDK1) i la segona, que farà incrementar l'activitat d'Akt fins a 10 vegades, es fa al residu serina 473 (Ser473) per mTORC2 (del'anglès *mechanistic target of rapamycin complex 2*).

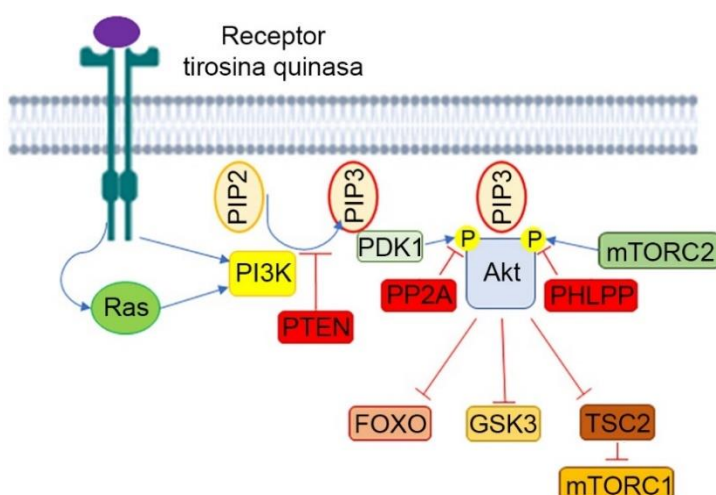


Fig16. Via de senyalització PI3K/Akt. Esquema on es mostra la via de senyalització d'Akt. L'activació de la PI3K per un receptor tirosina quinasa o per Ras provoca un augment de PIP3 que activa PDK1. Akt és reclutat per PIP3 i fosforilat per PDK1 i mTORC2. Akt actiu fosforila diferents substrats que promouen el creixement i supervivència cel·lular com mTORC1, GSK3 β i FOXO. Diferents fosfatases (vermell) regulen el temps de vida de la via.

(imatge modificada de (Hemmings and Restuccia, 2012))

Només amb la primera fosforilació, la del residu Th308, Akt ja pot activar mTORC1 que té com a substrats diferents factors de transcripció que promouran la síntesi de proteïnes i la proliferació cel·lular. Amb la fosforilació al residu Ser473 per mTORC2, Akt és totalment activa i té moltíssims substrats, un d'ells és la GSK3 β , però també actua sobre factors de transcripció com FOXO (de l'anglès *forkhead box O family transcription factor*) o mTORC1. El resultat és un increment de la proliferació i supervivència cel·lular i del creixement (Hemmings and Restuccia, 2012)(Manning and Toker, 2017)(Leibinger et al., 2019).

La unió d'Akt al PIP3 de la membrana és un punt clau per la seva activació. L'activació de la proteïna PI3K farà augmentar els nivells de PIP3. Tant Akt com PDK1 tenen el domini PH, per tant són reclutats per PIP3 a la membrana que activarà directament a PDK1. PDK1 activarà Akt fosforilant el domini Th308. Al contrari que PDK1, mTORC2 no depèn de l'activitat de la PI3K. La simple unió d'Akt a la membrana ja permet que mTORC2 fosforili el residu Ser473 i augmenti així la seva activitat (Yudushkin, 2019).

La inactivació d'Akt es dona per l'acció de diferents fosfatases. La PP2A (de l'anglès *protein phosphatase 2*) defosforila el residu Th308, la PHLPP1/2 (de l'anglès *PH-domain leucine-rich-repeat-containing protein phosphatases*) el residu Ser473 i PTEN (de l'anglès *phosphatase and tensin homolog*) converteix el PIP3 a PIP2. D'aquesta manera, la defosforil·lació dels dos residus i la conversió de PIP3 en PIP2 regularan el temps de vida d'acció de la cascada PI3K/Akt (Hemmings and Restuccia, 2012).

Estudis fets *in vitro* demostren que l'activació de mTORC1 i Rac1 per Akt provoca un increment de la ramificació axonal i una expansió del conus de creixement (Grider et al., 2009), i que al activar Akt a través de la senyal de la neurotrofina NGF provoca la formació de fil·lopodis i ramificacions (Ketschek and Gallo, 2010). També s'ha demostrat que 7 dies després d'una axotomia *in vivo* s'incrementa la fosforilació d'Akt i que quan l'inhibeixen, la supervivència neuronal disminueix, igual que el número i llargada d'axons que regeneren (Huang et al., 2017). La inhibició de GSK3 i PTEN s'ha demostrat que incrementa la regeneració axonal de la medul·la de rata després d'una lesió (Tang, 2018)(Leibinger et al., 2019).

5.5. L'òxid nítric.

L'òxid nítric (NO) és una molècula gasosa que ha estat molt estudiada en el seu paper en l'aprenentatge, la memòria, la neurogènesi i la transmissió sinàptica. Aquesta molècula però, també actua sobre el citoesquelet incrementant el creixement de les neurites i els fil·lopodis (Van Wageningen and Rehder, 2001)(Welshhans and Rehder, 2005)(Tojima et al., 2009)(Sild et al., 2016).

El NO no pot ser emmagatzemat a l'interior de les cèl·lules, per tant depèn de la seva síntesi de nou per tal de poder exercir les seves funcions. El NO és sintetitzat per l'enzim òxid nítric sintasa (NOS). Hi ha tres tipus de NOS: l'endotelial (eNOS), la induïble (iNOS) i la neural (nNOS). La nNOS s'expressa de forma constitutiva a les neurones madures i immadures del SNC i SNP. La seva forma activa és en forma de dímer, pot trobar-se tant a la membrana com en el citosol, i la seva activitat està regulada pel calci. Un activador de la nNOS és la calmodulina (CaM). Quan hi ha un increment de calci intracel·lular en resposta d'algun estímul extern, la CaM s'uneix a nNOS i l'activa. Un cop actiu, nNOS oxida la L-arginina i genera citrul·lina i NO. A través del seu domini PDZ pot unir-se a altres proteïnes que també el tinguin, com moltes de les proteïnes relacionades amb l'actina, cosa que li permet situar-se prop de la membrana plasmàtica i contactar amb el citoesquelet (Su et al., 2005)(Zhou and Zhu, 2009)(Forstermann and Sessa, 2012).

La via de senyalització canònica del NO és la que acaba amb l'activació de la proteïna quinasa G (PKG) en la que el NO activa la guanilat ciclasa soluble (sGC) i aquesta fa incrementar els nivells de cGMP que activarà la PKG (**Fig17**). PKG té molts substrats, entre ells Akt, ERK (de l'anglès *extracellular signal regulated kinase*), Src i la proteïna associada a l'actina VASP. L'activació d'aquesta via promou la supervivència de la neurona i la remodelació del citoesquelet necessari pel creixement.

Durant l'etapa embrionària, s'ha vist que els DRG expressen nNOS i que la seva activitat és important durant el creixement de les neurites. La seva activitat decau a mesura que les neurones maduren però després d'una lesió, nNOS torna a activar-se i l'increment de NO ajuda a la regeneració d'aquest tipus de neurona (Thippeswamy and Morris, 2002).

Hi ha discrepàncies en la literatura sobre les conseqüències del NO en el conus de creixement. Mentre que alguns descriuen que incrementa la dinàmica del conus i la

formació de fil·lopodis (Van Wagenen and Rehder, 2001)(Welshhans and Rehder, 2005)(Cooke et al., 2013)(Sild et al., 2016), altres diuen que provoca la retracció dels axons, dels lamel·lipodis i el col·lapse (Cossenza et al., 2014)(Redondo et al., 2015). Estudis recents suggereixen que el NO esta involucrat en la migració i proliferació de les cèl·lules de Schwann i en la regeneració axonal després d'una lesió al SNP (Kikuchi et al., 2018). Aquestes diferències en la literatura pot ser un reflex del fet que l'efecte del NO depèn de la seva concentració i de les moltes possibles interaccions que pot fer amb altres molècules de senyalització. Mentre que concentracions molt elevades de NO, produïts per iNOS, activaran vies que estan relacionades amb la inducció de la mort cel·lular, concentracions lleugerament superiors als nivells basals, produïdes per eNOS i nNOS, promouen la supervivència cel·lular (Cossenza et al., 2014).

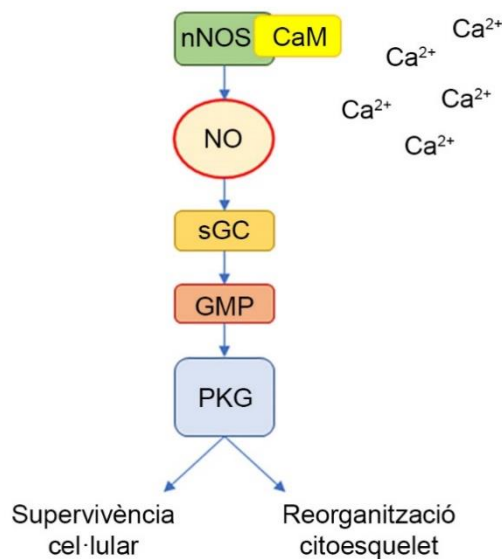
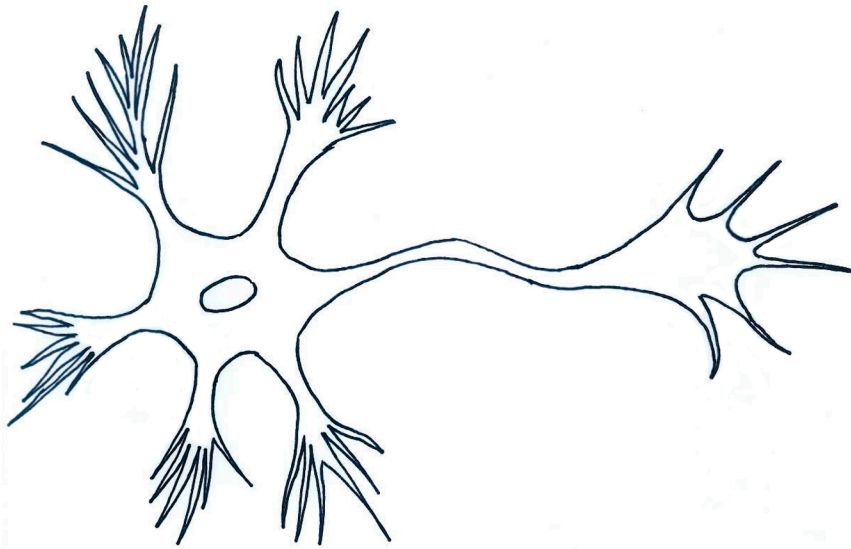


Fig17. Via de senyalització NO/cGMP/PKG. Esquema on es mostra la via de senyalització activada per nNOS per un increment de calci (Ca^{2+}). L'increment lleugerament per sobre dels nivells basals de NO porta a l'activació de PKG i aquesta activa cascades de senyalització que promouen la supervivència cel·lular i la reorganització del citoesquelet.

(imatge modificada de (Tojima et al., 2009))



2. Objectius

Tal i com s'ha descrit a la introducció, la guia axonal és clau per a un correcte desenvolupament i regeneració del SN. En aquests processos participen diferents mecanismes com el citoesquelet, receptors de molècules guia i l'aportació de nova membrana al conus de creixement. Les proteïnes SNARE estan involucrades en la guia axonal participant en els processos d'exocitosi i endocitosi durant l'atracció i repulsió que es dona quan un receptor s'uneix al seu lligand. Molts d'aquests receptors solen estar localitzats en microdominis de membrana rics en colesterol anomenats *lipid rafts*.

En aquesta tesi ens centrem en la importància de les SNARE, en concret la STX1, en processos de guia axonal durant el desenvolupament, i també en la importància dels *lipid rafts* en el creixement i la regeneració neural.

Concretament ens vam plantejar els següents objectius:

- 1. Estudiar i comparar el paper de la STX1 en la guia axonal de les neurones comissurals de ratolí amb els models animals de mosca i pollastre *in vivo*.**

En el nostre laboratori s'havien fet estudis de guia axonal *in vitro* on es va demostrar que tractaments amb la toxina butolínica C1, que bloqueja la funció de diferents proteïnes SNARE com la STX1, reduïa la quimioatracció de les neurones comissurals de la zona dorsal de la medulla espinal davant de Netrina-1 (Cotrufo et al., 2011)(Cotrufo et al., 2012). Aprofitant que disposàvem de la colònia de ratolins KO per la STX1 A i B, i com a experiment complementari pel primer article presentat en aquesta tesi, on s'estudia el paper de la STX1 en la guia axonal en els models de mosca i pollastre, ens vam plantejar estudiar si les neurones d'aquests ratolins responien correctament a diferents molècules de guia axonal.

- 2. Investigar el paper dels *lipid rafts* en la regeneració neural.**

S'ha demostrat que els *lipid rafts* són necessaris per a la correcta senyalització de diferents molècules guia com les Semaforines, les Efrines, els Slit i la Netrina-1. A més,

molts receptors de molècules inhibidores del creixement estan localitzats en *lipid rafts* i el fet que aquests microdominis tinguin una composició lipídica que proporciona rigidesa a les membranes, va fer qüestionar-nos si la seva eliminació afectaria a la capacitat regenerativa dels axons. Amb l'ús de diferents fàrmacs, vam estudiar els efectes que provoca la disminució del colesterol de les membranes sobre el creixement axonal i la seva capacitat regenerativa, en diferents tipus neuronals del SNC i SNP tan *in vitro* com *in vivo*.

3. Investigar el mecanisme d'acció de la Nistatina mitjançant el qual incrementa la regeneració axonal.

La Nistatina és un antifúngic que té la capacitat d'unir-se als esterols de la membrana. Durant el desenvolupament de l'objectiu 2, vam adonar-nos que dels tres composts utilitzats, la Nistatina era el més efectiu a nivell regeneratiu *in vitro*. La Nistatina, a més, presenta un interès addicional ja que és un fàrmac d'ús corrent, posicionant-se com a una alternativa per desenvolupar un possible tractament per lesions medul·lars. Això ens va portar a estudiar quina seria la via de senyalització intracel·lular que, juntament amb l'alteració del nivell de colesterol de les membranes, podria estar implicada en el control del creixement axonal exercit per la Nistatina.

Informe sobre les publicacions
derivades d'aquesta tesi

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
 Facultat de Biologia
 Av. Diagonal 645
 08028 Barcelona



El Dr. Eduardo Soriano García, Catedràtic del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, i el Dr. Ramón Martínez Mármol, investigador Postdoctoral al Queensland Brain Institute de la Universitat de Brisbane, com a codirectors de la Tesi Doctoral de la Cristina Roselló Busquets.

Informen

que, fruit de la realització del seu projecte de Tesi Doctoral “Paper de la Syntaxina-1 i els *lipid rafts* en guia axonal i regeneració neural”, la candidata a Doctora Cristina Roselló Busquets ha participat activament en l’elaboració de dos articles publicats en revistes internacionals i un en procés d’elaboració:

1. A conserved role for Syntaxin-1 in pre- and post-commissural midline axonal guidance in fly, chick, and mouse.

Oriol Ros*, Pablo José Barrecheguren*, Tiziana Cotrufo*, Martina Schaeftin, **Cristina Roselló-Busquets**, Alba Vílchez-Acosta, Marc Hernaiz-Llorens, Ramón Martínez-Marmol, Fausto Ulloa, Esther T. Stoeckli, Sofia J. Araújo, Eduardo Soriano. PLoS Genet. 2018 Jun 18;14(6):e1007432. doi: 10.1371/journal.pgen.1007432. eCollection 2018 Jun. *Aquests autors han contribuït de la mateixa manera. Factor d’impacte: 5.54

Aquest article forma part del primer capítol de resultats d’aquesta Tesi Doctoral.

2. Cholesterol Depletion Regulates Axonal Growth and Enhances Central and Peripheral Nerve Regeneration.

Cristina Roselló-Busquets*, Natalia de la Oliva*, Ramón Martínez-Mármol*, Marc Hernaiz-Llorens, Marta Pascual, Ashraf Muhaisen, Xavier Navarro, Jaume del Valle and Eduardo Soriano. Front Cell Neurosci. 2019 Feb 12;13:40. doi: 10.3389/fncel.2019.00040. eCollection 2019. *Aquests autors han contribuït de la mateixa manera. Factor d’impacte: 4.3

Aquest article forma part del segon capítol de resultats d’aquesta Tesi Doctoral.

3. Nystatin regulates axonal extension and regeneration by modifying the levels of nitric oxide.

Cristina Roselló-Busquets, Marc Hernaiz-Llorens, Eduardo Soriano and Ramón Martínez-Mármol.

Article en procés d'elaboració per ser enviat a publicar.

Aquest article forma part del tercer capítol de resultats d'aquesta Tesi Doctoral.

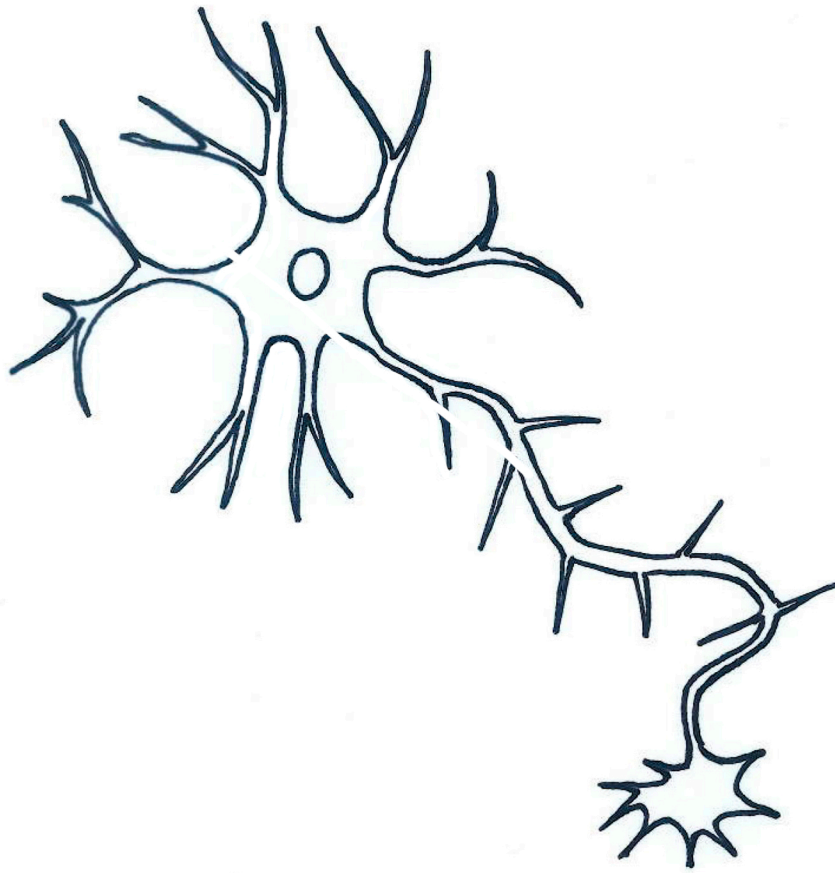
La Cristina ha participat activament en la realització de totes les publicacions. En el primer article només va participar en les correccions proposades pels revisors i, per tant, només va realitzar els experiments, l'adquisició d'imatges i quantificacions de l'atracció dels explants dels ratolins KO per STX1A/B confrontats a Netrina-1, els experiments de colocalització de ROBO3 amb les diferents SNARE i els experiments d'expressió a membrana de ROBO 3 en cultius primaris de neurones comissurals dels ratolins WT i KO per STX1A/B. En el segon article ha contribuït en la planificació i realització dels experiments *in vitro*, les quantificacions, l'obtenció d'imatges, el muntatge de figures, l'escriptura i la revisió de la publicació. En el cas del tercer article ha contribuït en la planificació i realització dels experiments, les quantificacions, l'obtenció d'imatges, el muntatge de figures i l'escriptura. Tot això justifica la seva posició com a primera coautora en el segon article i com a primera autora en el tercer.

I perquè consti per la presentació de la Tesi Doctoral de la Cristina Roselló Busquets, firmen el present infome.

Atentament,

Dr. Eduardo Soriano García

Dr. Ramón Martínez Mármol



3. Resultats

A conserved role for Syntaxin-1 in pre- and post-commissural midline axonal guidance in fly, chick, and mouse.

Oriol Ros^{1,2}, Pablo José Barrecheguren^{1,3}, Tiziana Cotrufo^{1,2}, Martina Schaettin⁴, Cristina Roselló-Busquets^{1,2}, Alba Vílchez-Acosta^{1,2}, Marc Hernaiz-Llorens^{1,2}, Ramón Martínez-Marmol^{1,2,x}, Fausto Ulloa^{1,2}, Esther T.Stoeckli⁴, Sofia J.Araújo^{3,5,6}, Eduardo Soriano^{1,2,7,8}

- (1) Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia i Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya.
 - (2) Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa sobre Malalties Neurodegeneratives (CIBERNED), ISCIII, Madrid, Espanya.
 - (3) Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB Barcelona), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Espanya.
 - (4) Institut de Ciències de la Vida Molecular i Centre de Neurociències de Zurich, Universitat de Zurich, Zurich, Suïssa.
 - (5) Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Espanya.
 - (6) Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Espanya.
 - (7) Institut de Recerca de la Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona, Espanya.
 - (8) Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Espanya.
- (+) Adreça actual: Centre Clem Jones per la Recerca de la demència associada a l'envelliment, Institut Queensland Brain, Brisbane, Queensland, Austràlia.

Resum

El creixement i la guia axonal depenen de la correcta integració i resposta que fa el conus de creixement de les molècules que l'envolten. Les cascades de senyalització que regulen el creixement axonal i la dinàmica del citoesquelet han sigut àmpliament estudiades, en canvi, es coneix molt poc sobre els mecanismes que vinculen la guia dels axons i la dinàmica de membrana i el seu reciclatge. Estudis recents demostren que l'exocitosi és

necessària per a l'atracció de l'axó, mentre que l'endocitosi ho és per la repulsió. A més, en estudis previs del nostre laboratori s'ha demostrat que la senyalització de Netrina-1 a través de DCC provoca exocitosi a través de la proteïna SNARE STX1. Tot i així, no hi ha gaires estudis *in vivo* sobre el paper de les proteïnes SNARE en guia axonal. Per fer front a aquest objectiu, en aquest article eliminem sistemàticament gens de proteïnes SNARE en tres espècies d'animals. Demostrem que la pèrdua de funció de la STX1 provoca defectes en la guia axonal de les neurones pre- i post-comissurals a la línia mitja en embrió de mosca, pollastre i ratolí. La inactivació de VAMP2, Ti-VAMP i SNAP25 comporten errors addicionals en la guia axonal. A més a més, confirmem que la pèrdua de funció de la STX1 comporta una pèrdua de sensibilitat dels axons comissurals a Slit-2 i Netrina-1. Per últim, hem fet estudis d'interacció genètica en *Drosophila* i hem demostrat que la STX1 interacciona tant amb la via de senyalització de Netrina-1/DCC com amb la de Slit/ROBO. Els nostres resultats donen evidència del paper conservat evolutivament de la STX1 i les proteïnes SNARE en la guia axonal de les neurones pre- i post-comissurals a la línia mitja *in vivo*.

Aquest article ha estat publicat a la revista PLOS GENETICS, 18 Juny 2018; 14(6)

Ros, O., Barrecheguren, P. J., Cotrufo, T., Schaettin, M., Roselló-Busquets, C., Vílchez-Acosta, A., et al. (2018). A conserved role for Syntaxin-1 in pre- and post-commissural midline axonal guidance in fly, chick, and mouse. *PLOS Genet.* 14, e1007432. doi:10.1371/journal.pgen.1007432.

RESEARCH ARTICLE

A conserved role for Syntaxin-1 in pre- and post-commissural midline axonal guidance in fly, chick, and mouse

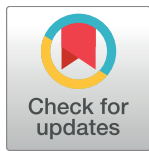
Oriol Ros^{1,2}, **Pablo José Barrecheguren**^{1,3}, **Tiziana Cotrufo**^{1,2}, **Martina Schaettin**⁴, **Cristina Roselló-Busquets**^{1,2}, **Alba Vilchez-Acosta**^{1,2}, **Marc Hernaiz-Llorens**^{1,2}, **Ramón Martínez-Marmol**^{1,2}, **Fausto Ulloa**^{1,2}, **Esther T. Stoeckli**^{4*}, **Sofia J. Araujo**^{3,5,6*}, **Eduardo Soriano**^{1,2,7,8*}

1 Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology and Institute of Neurosciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), ISCIII, Madrid, Spain, **3** Institut de Recerca Biomedica de Barcelona (IRB Barcelona), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain, **4** Institute of Molecular Life Sciences and Neuroscience Center Zurich, University of Zurich, Zurich, Switzerland, **5** Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain, **6** Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **7** Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Barcelona, Spain, **8** Institutió Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

☞ These authors contributed equally to this work.

✉ Current address: Clem Jones Centre for Ageing Dementia Research, Queensland Brain Institute, The University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia

* esther.stoeckli@imls.uzh.ch (ETS); sarbmc@ibmb.csic.es (SJA); esoriano@ub.edu (ES)



OPEN ACCESS

Citation: Ros O, Barrecheguren PJ, Cotrufo T, Schaettin M, Roselló-Busquets C, Vilchez-Acosta A, et al. (2018) A conserved role for Syntaxin-1 in pre- and post-commissural midline axonal guidance in fly, chick, and mouse. *PLoS Genet* 14(6): e1007432. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007432>

Editor: Cecilia Moens, Fred Hutchinson Cancer Research Center, UNITED STATES

Received: July 28, 2017

Accepted: May 18, 2018

Published: June 18, 2018

Copyright: ©2018 Ros et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by MINECO (to ES: SAF2013-42445-R, SAF2016-7426 and BFU2010-21507; FU: RYC-2007-00417; and SJA: RYC-2009-05510), ISCIII (to ES: CIBERNED), Ministerio de Educación, Cultura y Arte (to OR: AP2005-1662), Fundació La Caixa (to PJB) and the Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der

Abstract

Axonal growth and guidance rely on correct growth cone responses to guidance cues. Unlike the signaling cascades that link axonal growth to cytoskeletal dynamics, little is known about the crosstalk mechanisms between guidance and membrane dynamics and turnover. Recent studies indicate that whereas axonal attraction requires exocytosis, chemorepulsion relies on endocytosis. Indeed, our own studies have shown that Netrin-1/ Deleted in Colorectal Cancer (DCC) signaling triggers exocytosis through the SNARE Syntaxin-1 (STX1). However, limited *in vivo* evidence is available about the role of SNARE proteins in axonal guidance. To address this issue, here we systematically deleted SNARE genes in three species. We show that loss-of-function of STX1 results in pre- and post-commissural axonal guidance defects in the midline of fly, chick, and mouse embryos. Inactivation of VAMP2, Ti-VAMP, and SNAP25 led to additional abnormalities in axonal guidance. We also confirmed that STX1 loss-of-function results in reduced sensitivity of commissural axons to Slit-2 and Netrin-1. Finally, genetic interaction studies in *Drosophila* show that STX1 interacts with both the Netrin-1/DCC and Robo/Slit pathways. Our data provide evidence of an evolutionarily conserved role of STX1 and SNARE proteins in midline axonal guidance *in vivo*, by regulating both pre- and post-commissural guidance mechanisms.

Wissenschaftlichen Forschung (to ETS: 3100A_130730 and 31003A_166479). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Syntaxin-1 is a core factor in tethering synaptic vesicles and mediating their fusion to the cell membrane at the synapse. Thus, Syntaxin-1 mediates neurotransmission in the adult nervous system. Here we show that this protein is also involved in axonal guidance in the CNS of vertebrates and invertebrates during the development of the nervous system: our systematic analysis of the phenotypes in the nervous system midline of fly, chick, and mouse embryos mutant for Syntaxin-1 unveils an evolutionarily conserved role for this protein in midline axonal guidance. Further, we also dissect the contribution of other proteins regulating neuronal exocytosis in axonal development. We propose that the coupling of the guidance molecule machinery to proteins that regulate exocytosis is a general mechanism linking chemotropism to axonal growth.

Introduction

Axonal growth and guidance are responsible for the correct formation of neural circuits. These processes rely on the tightly regulated response of the growth cone to both diffusible and membrane-bound guidance cues. In response to such cues, several intracellular signaling cascades are activated within the growth cone, leading to directional growth. For instance, the chemoattractant Netrin-1 binds to the receptor Deleted in Colorectal Cancer (DCC) at growth cones, activating several kinases and small GTPases, cyclic nucleotides, and calcium cascades, as well as cytoskeletal rearrangements [1–8].

In contrast, few reports have addressed the cross-talk mechanisms between axonal guidance and membrane dynamics and turnover, other than the fact that growth cones are filled by vesicles and express most SNARE (Soluble NSF Attachment Protein REceptor) and exocyst proteins [9–13]. A growing number of reports using *in vitro* approaches indicate that axon guidance mechanisms require the participation of SNARE-mediated exocytosis for chemoattraction and endocytosis for repulsion [14–18]. Thus, it has been demonstrated that the vSNARE (vesicular SNARE) VAMP2 is required for L1-mediated chemoattraction [19] and for Sema3A-induced chemorepulsion [17], that the vSNARE Ti-VAMP and the tSNARE (target SNARE) SNAP25 are necessary for neurite outgrowth [20–22], and that Syntaxin-1 (STX1) is required for Netrin-1-mediated attraction of axons and migrating neurons [15,16].

However, the participation of these proteins in neural circuit formation *in vivo* is still controversial. For instance, mice deficient for the SNAP25 and VAMP2 proteins show virtually no neural circuitry defects but do present a severe alteration of evoked synaptic activity [23–25]. Ti-VAMP-deficient mice display behavioral defects but no alterations in gross brain morphology [26]. STX1A knock-out (KO) mice show only mild cognitive defects and a normal brain structure [27] and axonal defects have not been described in STX1B KO [28]. In a previous study we showed that STX1A is required for the navigation of dorsal commissural in the chick spinal cord [16]. Syntaxin-1 loss-of-function in *Drosophila* and chick embryos results in motor axonal defects [29].

Drosophila melanogaster displays neural expression of a synaptobrevin (VAMP) gene, namely *n-synaptobrevin* (*n-syb*) [30] and a SNAP25 homolog, *Snap25* [31]. Mutations in these components of the core SNARE complex give rise to neurotransmitter release phenotypes [32]. A single *D. melanogaster* STX1 homolog, *Syntaxin1A* (*Syx1A*), has been identified that shows strong homology to rodent STX1A [33–35]. Mutations in this gene are homozygous lethal, with severe alleles resulting in early embryonic death. In *D. melanogaster*, loss of *Syx1A* abolishes synaptic transmission [33,36], and other secretion phenotypes, such as soft cuticle

and undigested yolk, have also been reported [33]. In addition, *Syx1A* is involved in cell membrane formation during cellularization [37] and in the condensation of the embryonic CNS [33]. In addition, *Syx1A* has been reported to affect the properties of neuronal membranes and influence membrane dynamics throughout development [38]. However, in *D. melanogaster*, in contrast to vertebrates, *Syx1A* has yet to be directly implicated in axonal guidance.

Here we systematically inactivated SNARE genes in three species, *Drosophila melanogaster*, chick, and mouse, to determine the role of SNARE proteins in CNS midline axonal guidance *in vivo*. We show the involvement of this protein complex, in particular STX1, in *D. melanogaster* and chicken axonal guidance, reporting aberrant phenotypes. Furthermore, we provide the first description of abnormal midline axonal defects in mouse embryos double mutant for STX1A and STX1B. Our results point to an evolutionarily conserved mechanism of SNARE complex proteins in midline axonal guidance.

Results

Loss of function of *Syx1A* causes specific axon guidance defects in *D. melanogaster*

To determine whether *Syx1A* affects axon guidance at the midline of *D. melanogaster* embryos, we started by analyzing the CNS phenotypes of *Syx1A* mutant embryos. For this purpose, we used zygotic mutants, since *Syx1A* has a maternal contribution and its function is required for proper cellularization [37].

In *D. melanogaster*, CNS axons of wild-type (wt) embryos are found in a stereotypic ladder-like arrangement. Within each neuromere, two commissures link the two halves of the nervous system. Individual neuromeres are connected by axons running in discrete fascicles in the lateral connectives. An antiserum that specifically recognizes *D. melanogaster* *Syx1A* revealed that, like Frazzled (Fra, the *D. melanogaster* DCC homolog) [39], *Syx1A* is expressed in developing axons in the embryo from stage 13. At later stages, this isoform is expressed at high levels on commissural and longitudinal axons in the developing CNS (Fig 1A). Embryos of the null *Syx1A*⁴²²⁹ genotype [33] displayed no detectable *Syx1A* protein in the ventral nerve cord (VNC) when stained with the same antibody (Fig 1B).

To analyze axonal midline phenotypes, we stained embryos with HRP, which marks all axons in the CNS, and anti-Fasciclin II antibodies (anti-FasII), which label lateral fascicles (Fig 1C). At stage 15 or later, FasII identifies three major axonal tracts, which are visible as parallel straight lines: the medial (FasII-m or 1st), intermediate (FasII-i or 2nd) and lateral (FasII-l or 3rd) fascicle. In wt conditions, these FasII-positive axons do not cross the midline. Examination of the commissural and longitudinal pathways labelled by HRP and anti-FasII in the VNC of *Syx1A* mutants revealed specific defects in diverse axonal pathways. From stage 14 onwards, by analyzing FasII-positive axons, we detected guidance defects in the VNC of 50% of the embryos (n = 38). These defects included aberrant midline crossing, as well as abnormal arrangement of ipsilateral fascicles (Fig 1D, 1E and 1F). Of these embryos, 18% displayed strong defects (Fig 1D and 1F) and 32% weak defects (Fig 1E and 1F, see Materials and Methods for quantification methods and definition of weak and strong phenotypes). FasII-positive fibers never crossed the midline in wt conditions. In contrast, *Syx1A* embryos displayed clear abnormal crossing of FasII-positive axons, thereby suggesting that longitudinal fibers aberrantly cross the midline in *Syx1A* mutants (Fig 1G). When HRP staining (a pan-axonal marker) was used, control embryos presented regularly spaced commissures (Fig 1C and 1H). However, embryos with the strong *Syx1A* phenotype showed collapsed commissures with no clear separation between anterior and posterior ones (Fig 1D and 1H). We analyzed and quantified commissural phenotypes in the VNC of *Syx1A* embryos displaying phenotypes (weak

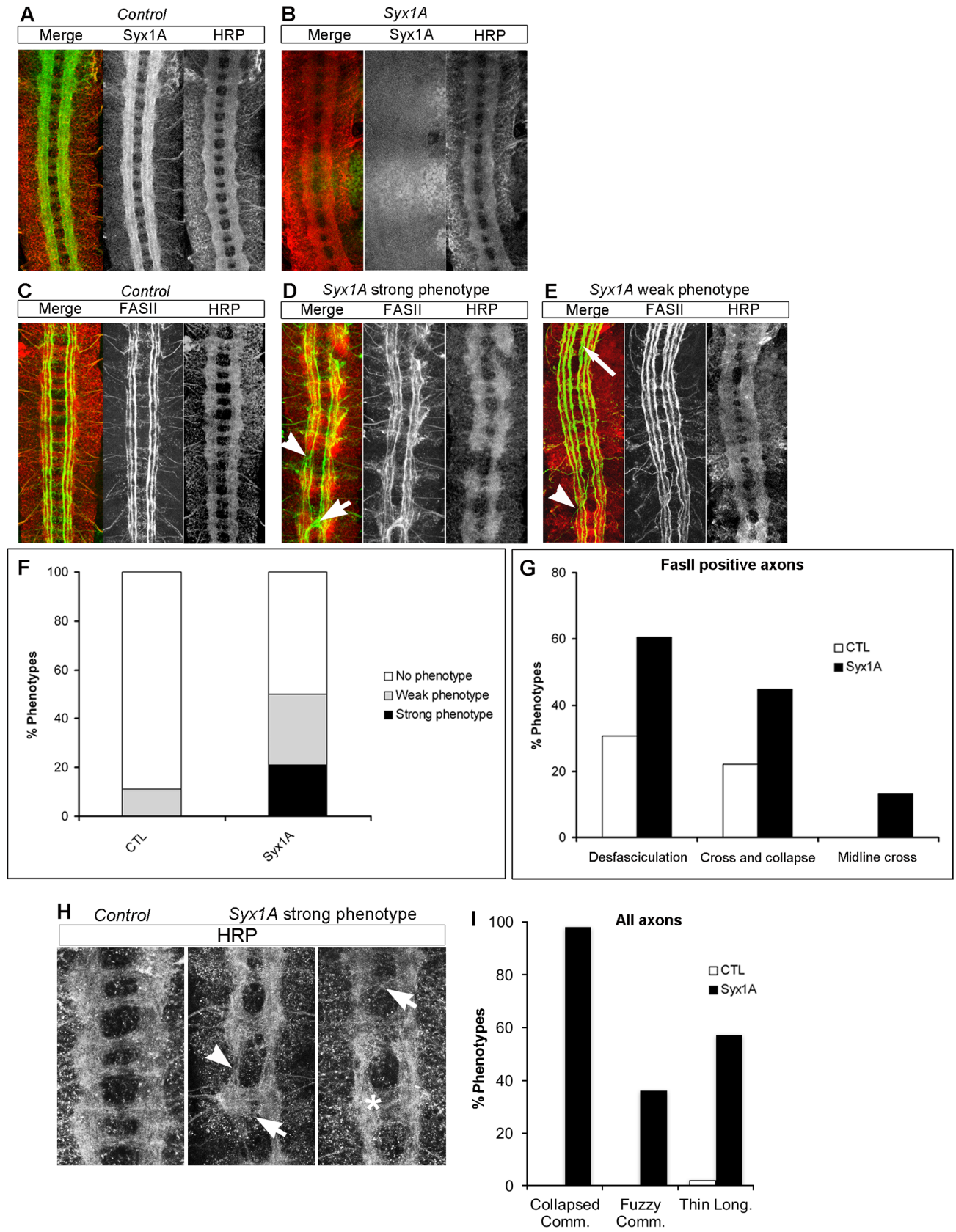


Fig 1. Axonal guidance defects found in the VNC of *Syx1A* mutant embryos. (A, B) Stage 16 embryos were stained with anti-Syx1A to detect Syntaxin 1 localization and with HRP to visualize the axon scaffold. A, Syx1A is detected in all axonal tracts, both commissural and longitudinal. B, Syx1A is not detected at these stages in *Syx1A^{Δ229}* mutant embryos. (C-E) Stage 16 embryos were stained with the anti-FasII mAb 1D4 to mark all FasII-positive axons and with HRP to visualize the axon scaffold. C, wt embryo showing the FasII-positive longitudinal connectives and the anterior and posterior commissures. D, *Syx1A^{Δ229}* mutant embryo representative of the strongest CNS phenotypes encountered; many commissures and longitudinal connectives are collapsed (arrowhead) and midline crosses (arrow) are observed. E, *Syx1A^{Δ229}* mutant embryo representative of the milder CNS phenotypes encountered; commissures are generally unaffected and defects are detected only in the longitudinal connectives, such as defasciculation (long arrow) and collapse (arrowhead). Anterior is up in all panels. (F) Quantification of the number of axon guidance defects encountered in *Syx1A^{Δ229}* mutants in comparison with the background defects in the wt. (G) Quantification of the diverse axonal guidance defects encountered in FasII positive axons in *Syx1A^{Δ229}* mutants in comparison with the background defects in the wt. (H) Higher magnification of *Syx1A^{Δ229}* mutant embryos representative of the wt and the strongest CNS phenotypes encountered by staining all axons with HRP; most commissures (98%) are thinner than in the wt; many segments (36%) show “fuzzy” commissures with a clear lack of separation between anterior commissure (AC) and posterior commissure (PC) (arrows and asterisk); longitudinal connectives are thinner between segments (arrowheads; 57% of cases) $n = 120$ segments; anterior is up. (I) Quantification of the axonal guidance defects encountered in all axons of *Syx1A^{Δ229}* mutants in comparison with the background defects in the wt when all axons are stained using anti-HRP antibody.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007432.g001>

and strong phenotypes, 50% of embryos). Collapsed commissures (98% Fig 1H, arrows, and 1I) and “fuzzy” commissures were detected in many segments (36%, Fig 1H, asterisk, and 1I), as well as thinning of longitudinal fascicles between segments (57%, Fig 1H, arrowhead, and 1I).

On average, *Syx1A* mutant embryos displayed more than one defect in VNC axonal guidance per embryo (Fig 1G). Among these defects, the strongest were axonal midline crosses (Fig 1D, short arrow, 13%), commissural thinning (Fig 1H and 1I, 55%), and thinner longitudinal fascicles (Fig 1H and 1I, 32%), which were not detected in controls. The most penetrant phenotypes were fasciculation defects (Fig 1E, long arrow, 58%), but *Syx1A* mutant embryos also showed fascicle collapse (Fig 1D and 1E, arrowhead, 42%). Variability among these axonal phenotypes between individuals possibly reflects the differential contribution of the maternally deposited gene product. These results show that loss of *Syx1A* function induces axonal guidance defects in both commissural and longitudinal axons at embryonic stages of fly CNS development.

D. *melanogaster* *nSyb*, *Snap25*, and *Vamp7* mutants display axonal guidance defects

We next used the same approach to study whether genetic loss of additional components of the SNARE core complex (SNAP25, VAMP2 and Ti-VAMP/VAMP7) also alters the commissural and longitudinal pathways in *D. melanogaster*. To do so, we examined mutants for *nSyb* (human VAMP2 ortholog) [40] and *Snap25* [41], and analyzed the *D. melanogaster* ortholog of Ti-VAMP/VAMP7 (*Vamp7* source:Flybase). Overall, the *nSyb*, *Snap25*, and *Vamp7* phenotypes were weaker than the *Syx1A* one (Fig 2A–2D). When analyzing FasII positive axons for fasciculation defects, the strongest axonal guidance phenotypes were found in *Snap25* mutants, in which 74% embryos displayed fascicle collapse, defasciculation, or both (Fig 2B and 2F, $n = 35$). 57% of *nSyb* mutants showed fascicle collapse, defasciculation, or both (Fig 2C and 2F, $n = 41$). In addition, a small percentage of *nSyb* embryos (4%, $n = 41$) showed axonal midline crosses of FasII positive axons (Fig 2C, arrow). *Vamp7* mutants exhibited the weakest phenotypes (Fig 2D and 2E $n = 31$). We could detect stronger phenotypes when all axons were visualized with BP102 antibody. Again, the strongest phenotypes were detected in *SNAP25* mutant embryos (Fig 2H and 2K) where 6.9% of embryonic segments showed fuzzy commissures and 27.5% showed thinning of longitudinal fibers ($n = 80$ segments). *nSyb* mutants displayed intermediate phenotypes, fuzzy commissures in only 3.1% of segments and thinning of longitudinal fibers in 10.6% ($n = 80$) (Fig 2I and 2K). In *Vamp7* embryos we could only detect thinning of commissures (in 5% of embryonic segments, $n = 80$) (Fig 2J and 2K). These results indicate that *Vamp7*, *nSyb*, and *Snap25* can also influence *D. melanogaster* axonal guidance at the midline, but to a lesser extent than *Syx1A*.

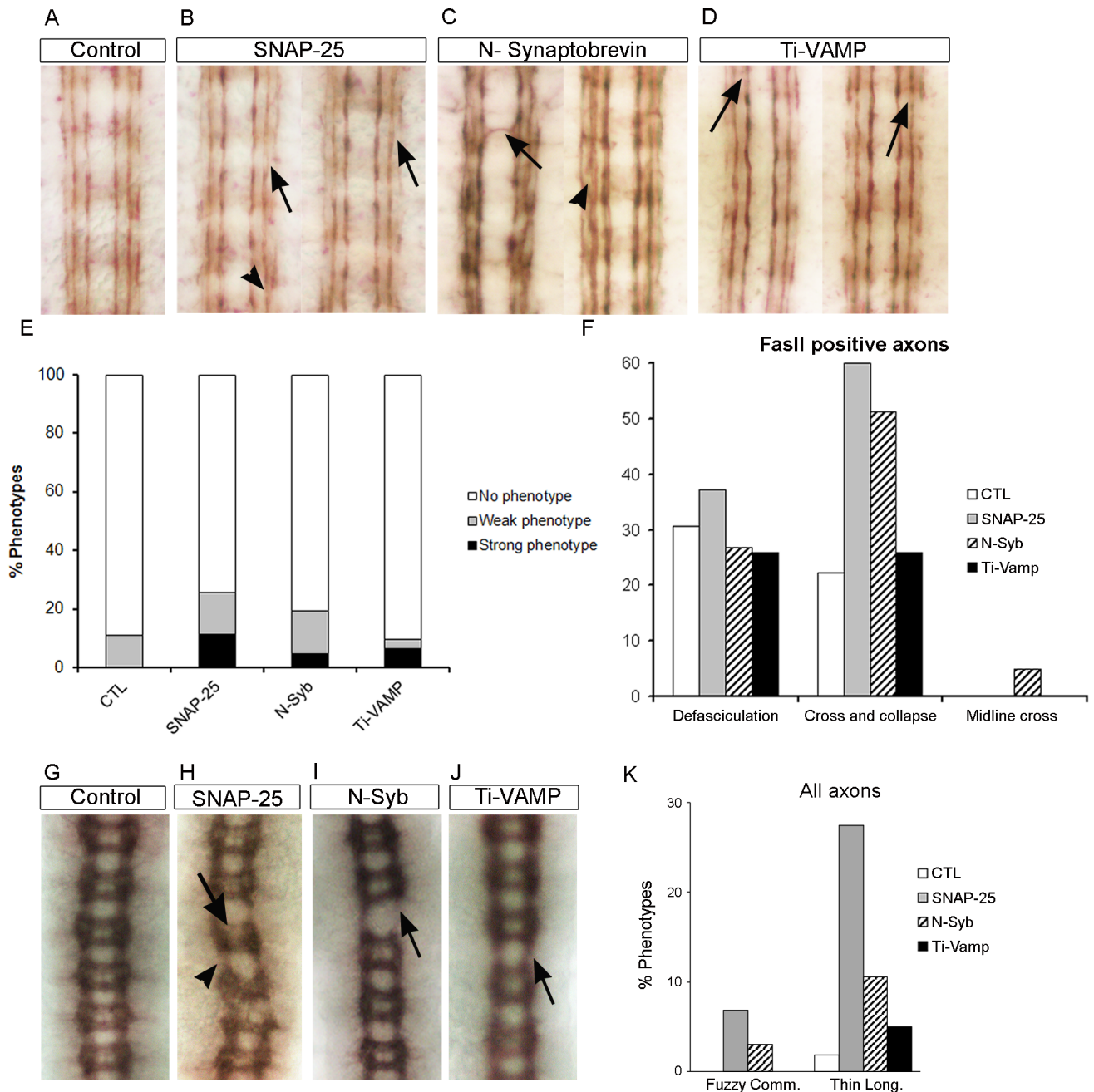


Fig 2. Diverse axonal pathway defects encountered in the VNC of *n-syb*, *snap-25*, and *Ti-VAMP* mutant embryos. (A-D) Stage 16 embryos were stained with anti-FasII to mark all FasII-positive axons and to better observe longitudinal axonal pathway defects. A, wt embryo showing the three FasII-positive longitudinal connectives. B, *SNAP-25* mutant embryos, representative of defasciculation (arrow) and fascicle collapse (arrowhead) phenotypes. C, *nSyb*^{d02894} mutant embryos, representative of midline crosses (arrow) and defasciculation phenotypes (arrowhead). D, *Vamp7* mutant embryos showing mild defasciculation phenotypes (arrow). (E) Quantification of the number of axon guidance defects encountered in *nSyb*, *SNAP-25*, and *Vamp7/Ti-VAMP* mutants in comparison with the background defects in the wt. (F) Quantification of the diverse axonal guidance defects encountered in *n-syb*, *SNAP-25*, and *Vamp7/Ti-VAMP* mutants in comparison with the background defects in the wt. (G-J) Stage 16 embryos were stained with BP102 antibody to mark all axons in the VNC. G, wt embryo showing a detail of 6 segments with its anterior and posterior commissures. H, *SNAP25* mutant embryos, representative of fuzzy commissures (arrow) and thinning of longitudinals (arrowhead) phenotypes. I, *nSyb*^{d02894} mutant embryos, representative of thinning of longitudinals (arrow). J, *Vamp7* mutant embryos showing mild thinning of longitudinals phenotype (arrow). (K) Quantification of the two axonal guidance defects encountered in *SNAP-25*, *n-syb* and *Vamp7/Ti-VAMP* mutants in comparison with the background defects in the wt.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007432.g002>

Silencing of SNARE proteins alters midline guidance of commissural axons in the chick spinal cord

Next, we used *in ovo* electroporation of double-stranded RNAs derived from STX1A, SNAP25, VAMP2, and Ti-VAMP to study the role of these genes in dII commissural axon guidance in the chicken spinal cord. In untreated controls and in EGFP-expressing control embryos, most commissural axons followed a stereotypic trajectory (Fig 3A and 3B). The vast majority of the dII axons crossed the floor plate and turned rostrally along the contralateral floor-plate border. See [Methods](#) for details on the quantification method. In contrast, we found that the down-regulation of all SNARE-complex proteins (STX1A, SNAP25, VAMP2, and Ti-VAMP) generated defects in commissural axon guidance, as axons either failed to enter or to cross the floor plate, or failed to turn into the longitudinal axis along the contralateral floor-plate border (Fig 3C–3G). After silencing STX1A aberrant axon pathfinding was found at 36% of the DiI injection sites per embryo (Fig 3C and 3G). We found overall similar percentages of injection sites with aberrant phenotypes when SNAP25, VAMP2 or Ti-VAMP were down-regulated (Fig 3G). When electroporated at embryonic day 3 (E3/HH17–18) most axons reached the floor plate and entered the midline area in all groups (Fig 3H). A detailed analysis of the aberrant phenotypes indicated a significant increase in floor-plate stalling in embryos where STX1A, VAMP2, or Ti-VAMP was silenced (Fig 3I). Similarly, turning of post-crossing axons was affected in all experimental groups (Fig 3J).

In a separate series of experiments, we compared electroporation of dsSTX1A at HH13/14 (E2) with electroporation at HH17/18 (E3) (Fig 3K). These experiments revealed an effect of timing of gene silencing on the severity of the phenotype. Electroporation at E3, when axons are starting to grow in the dorsal spinal cord, resulted in normal axon guidance at 56.4% of all DiI injection sites per embryo. In contrast, electroporation of neural precursors at E2 resulted in normal axon navigation only at 23.8% of all DiI injection sites. Importantly, failure of some axons to enter the floor plate was observed in 3/8 embryos electroporated early but was never observed in the embryos electroporated late. These data support the notion that the silencing of SNARE proteins in the chicken spinal cord leads to various commissural axon guidance defects.

STX1A/B mutant mice present axonal guidance defects in the spinal cord

To study the involvement of STX1 in commissural axon guidance in mammals, we generated double KO mice for the two STX1 isoforms, STX1A and STX1B. Double KO embryos died just after birth and displayed strong motor abnormalities, thereby suggesting severe alterations in nervous system organization. To address axonal phenotypes in the midline, we examined the commissural pathway in the spinal cord in E12 embryos [42,43]. In wt embryos, commissural axons stained with TAG-1 antibodies were organized as a narrow axonal bundle extending from the dorsal spinal cord towards the floor plate without invading the motorneuron area (Fig 4A and 4B). In contrast, in STX1A/B (-/-) mice, TAG-1-positive commissural axons were still directed towards the ventrally located floor plate, although their organization differed from that of controls. Instead of forming a narrow bundle, axons in STX1A/B (-/-) mice were clearly defasciculated, invading the entire mantle zone. Individual fibers or bundles invading lateral motorneuron areas were frequently observed (Fig 4C–4F). However, axons appeared to reach the floor plate. To support these observations, we quantified the width of the commissural pathway at three dorso-ventral levels (Fig 4C–4G). At each one, we found a significant difference in the width of commissural axon bundles between wt and double STX1 KO mice.

To confirm these findings, we stained spinal cord sections with Robo3 antibodies, a marker of pre-crossing and post-crossing commissural fibers. In wt embryos, Robo3-stained fibers

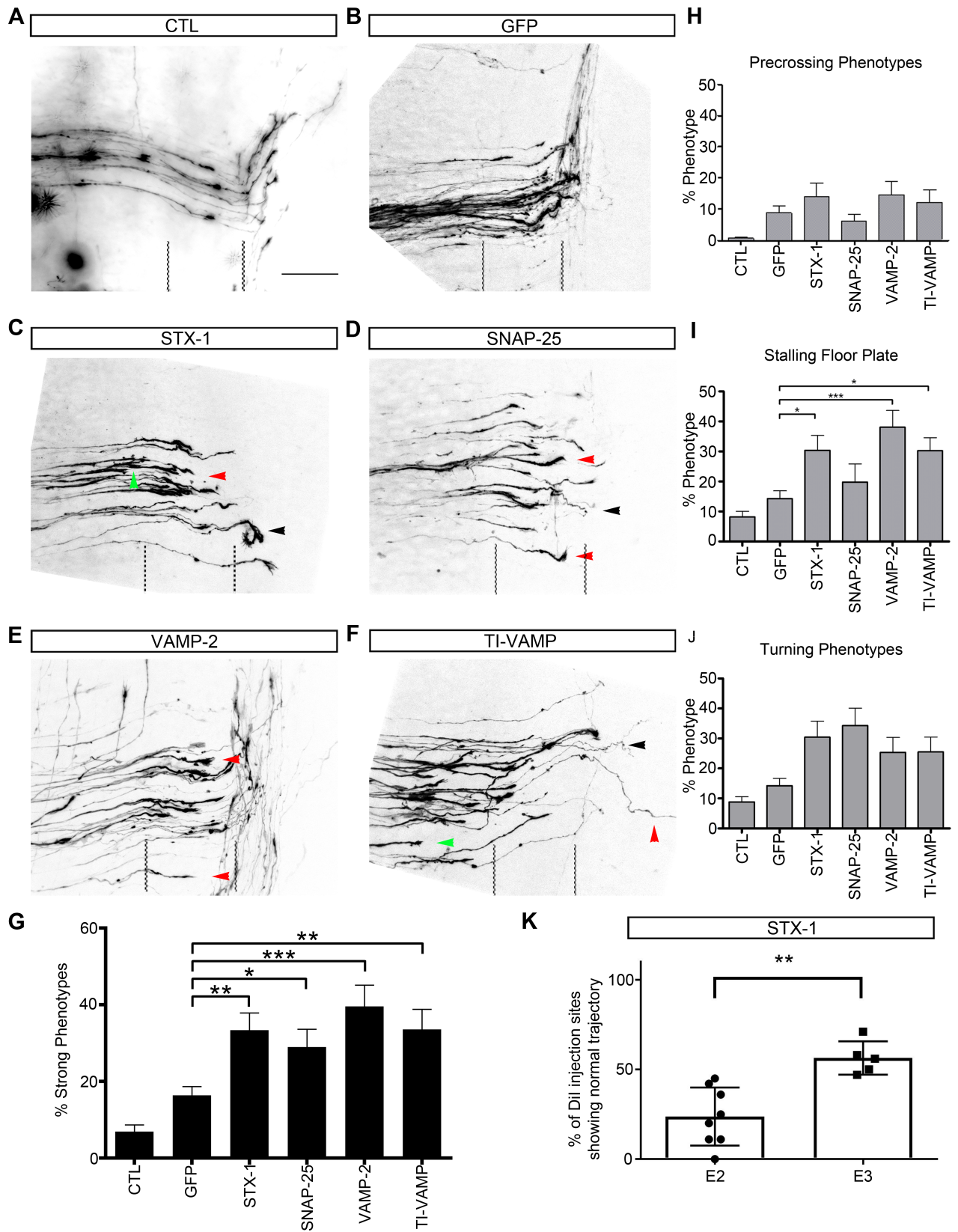


Fig 3. Silencing of SNARE proteins affected the guidance of commissural axons in chicken embryos. Commissural axons stained with the lipophilic dye DiI in open-book preparation of stage HH26 chicken embryos. In untreated control embryos (A) and in control embryos expressing EGFP (B) axons cross the midline and turn rostrally along the contralateral floor-plate border. In contrast, axonal tracing in embryos electroporated with dsRNA derived from STX-1A (C), SNAP-25 (D), VAMP-2 (E), or Ti-VAMP (F) revealed axonal stalling at the floor-plate entry site (green arrows), axonal stalling in the floor plate (red arrows), and aberrant or no turning into the longitudinal axis at the contralateral floor-plate border (black arrows). (G) After perturbation of SNARE signaling the percentage of DiI injection sites with normal axonal navigation per embryo was decreased: One-way ANOVA $F_{5,226} = 11.99$, $p < 0.0001$. Newman-Keuls multiple comparison test: GFP-STX1 $p < 0.01$; GFP-SNAP25 $p < 0.05$; GFP-VAMP2 $p < 0.001$; and GFP-TI-VAMP $p < 0.01$. (H) Downregulation of individual SNARE proteins at E3 did not significantly enhance stalling at the floor-plate entry site. (I) In contrast, commissural axons failed to cross the floor plate after silencing SYT1A, VAMP2, or Ti-VAMP. In all these groups, axonal stalling in the floor plate was significantly increased in comparison to the EGFP-expressing control group. One way ANOVA $F_{5,199} = 8.232$, $p < 0.0001$. Newman-Keuls multiple comparison test: GFP-STX-1 $p < 0.05$; GFP-SNAP25 $p > 0.05$; GFP-VAMP2 $p < 0.001$; and GFP-TI-VAMP $p < 0.05$. Because a strong stalling phenotype (I) prevents independent analysis of the turning phenotype (J), ANOVA analyses were not done separately for the different phenotypes. Rather we compared the average percentage of DiI injection sites per embryo exhibiting aberrant axon navigation (G). When electroporation of dsRNA derived from STX1 was carried out already at E2 (K) the number of DiI injection sites per embryo with normal axonal trajectories was much lower compared to electroporation at E3. Scale bar in A: 50 μm .

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007432.g003>

formed a tight fascicle directed towards the floor plate. Moreover, post-commissural fibers in the ventral spinal cord were heavily stained (S2A and S2B Fig). In contrast, commissural fibers in STX1A/B (-/-) embryos exhibited wider ipsilateral fascicles, often invading the lateral (motorneuron) domains in the ventral spinal cord. Many ipsilateral commissural axons in mutant embryos were tipped with growth cones indicating that they failed to reach the floor plate. Consistent with this observation, the bundles of post-crossing commissural axons (located in the ventral spinal cord) were markedly decreased in STX1A/B null-mutant embryos (S2C and S2D Fig). Taken together, our observations indicate that the lack of STX1 results in aberrant commissural axon growth on both ipsilateral and contralateral sides.

To confirm the above observations, we also examined commissural axon navigation in open-book preparations of E12 spinal cords (Fig 5). Comparable to our observation in the chicken spinal cord, we found aberrant navigation of dII axons at the floor plate. In the double STX1 KO embryos, almost no axons were found to cross the midline and to turn properly along the contralateral floor-plate border (Fig 5D and 5E). Axons mainly failed to reach the contralateral border of the floor plate. In embryos lacking STX1A but expressing STX1B from one or two wt alleles, axon guidance was still compromised, exhibiting intermediate phenotypes (Fig 5C, 5F and 5G). A quantitative analysis showed a pronounced decrease in normal axonal trajectories in mutant compared to wt embryos (Fig 5F). In wild-type mice we found normal axon trajectories at $75.6 \pm 6.3\%$ of the DiI injection sites per embryo. In contrast, in mice lacking STX1A but expressing one or two wild-type allele(s) of STX1B normal trajectories were only seen at $10.2 \pm 5.4\%$ or $21.7 \pm 12.3\%$ of the DiI injection sites, respectively. In double KO mutants axon navigation was affected even more strongly, as normal trajectories were only seen at 1% of the injection sites (Fig 5F and 5G). A detailed analysis of the different guidance defects revealed a problem in floor-plate stalling in all mutants in addition to a failure to turn rostrally along the contralateral floor-plate border. Failure to enter the floor plate was only found in mutants but never in wild-type mice (Fig 5G). Embryos having at least one wt allele of either STX1A or STX1B exhibited weaker axonal defects than the double KO mice (Fig 5G).

Syntaxin 1 is required for axonal sensitivity to Slit-2 and Netrin-1

To confirm the expression of SNARE proteins in spinal cord commissural axons we performed immunocytochemical analyses in neuronal cultures. Dissociated mouse commissural neurons were identified with two antibody markers: DCC and Robo3 antibodies. Cultures were co-immunostained for different SNARE proteins including STX1A, VAMP2, SNAP25 and Ti-VAMP. Confocal images revealed that commissural growth cones, identified by the expression

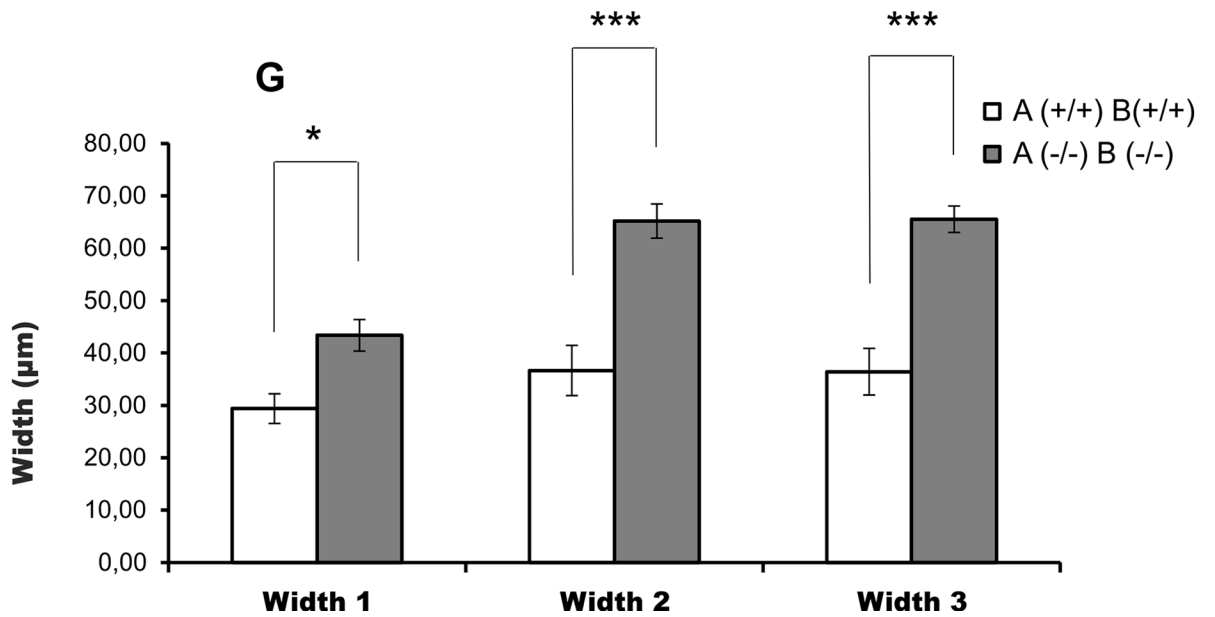
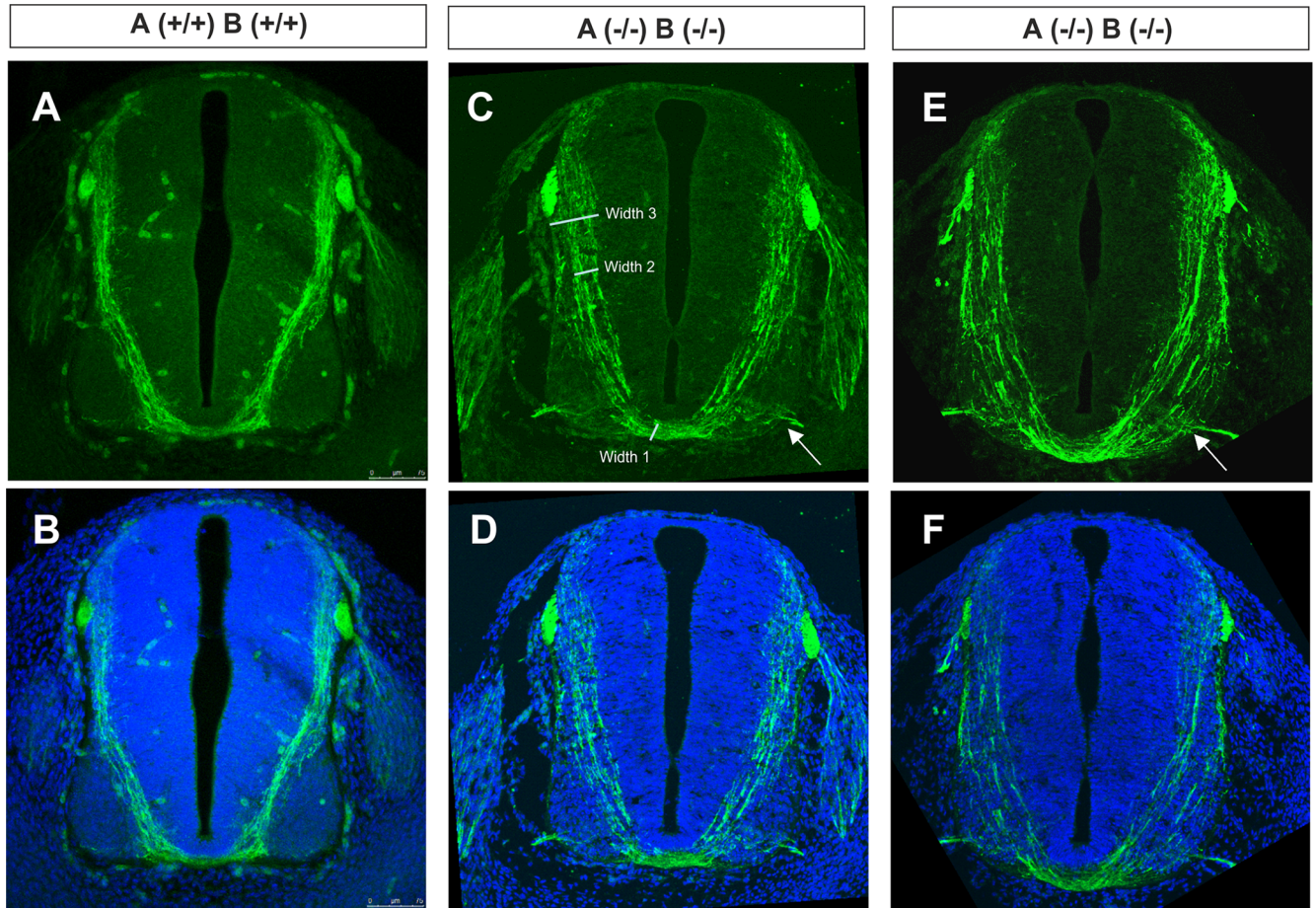


Fig 4. Syntaxin1 A/B mutant mouse embryos have aberrant axonal guidance phenotypes. (A-F) E12 mouse spinal cords; commissural axons immunostained with α -TAG-1 (A, C and E) and superposition with DAPI staining (B, D and F). (A) and (B) correspond to wt genotypes. The double KO genotype for STX1 (C-F) results in aberrant axonal guidance towards the floor plate. Axons are defasciculated and invade the motor column but still enter the floor plate. Arrows point at commissural axon bundles leaving the spinal cord ectopically through the motor exit point. (Scale bar: 75 μ m). (G) Histogram illustrating the axon bundle width at three levels of the transversal section of the spinal cord: width 1, width 2 and width 3 were measured in wt and KO spinal cords. Significant differences are labelled by asterisks (* $p \leq 0.05$), (** $p \leq 0.001$). In (C) an example of the measurements taken for the quantification of the commissural bundle width is shown. Data are presented as the mean \pm SEM. Statistical significance was determined using two-tailed Student's t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007432.g004>

of DCC and Robo3, co-expressed all the studied SNARE proteins (Fig 6). We also observed variable degrees of colocalization between DCC/Robo3 receptors and SNARE proteins. These results indicate that embryonic commissural axons express the SNARE proteins analyzed in the present study.

We next addressed whether STX1A is required for Slit-2 and Netrin-1 actions. Tissue explants of chick dorsal commissural neurons dissected from control embryos and grown on laminin are known to extend neurites readily in the absence of Slit-2 (Fig 7A). In the presence of Slit-2, neurite length was strongly reduced (Fig 7B). In contrast, neurite growth from explants taken from embryos electroporated with dsRNA derived from STX1A did not differ in the absence or presence of Slit-2 (Fig 7C, 7D and 7I), indicating that the absence of STX1A results in a markedly reduced Slit-2 response of chick commissural axons.

We have previously shown that the blockade of STX1 with Botulinum Toxin C1 reduces Netrin-1 induced chemoattraction in mouse spinal cord explants [16]. To confirm this finding, we co-cultured in collagen gels dorsal spinal cord explants from STX1 KO embryos with Netrin-1 expressing cell aggregates. In comparison with explants cultured with control cells (exhibiting radial growth, Fig 7E), wild-type explants confronted to aggregates of Netrin-1 expressing cells showed strong chemoattraction (Fig 7F and 7J). In contrast, Netrin-1 induced chemoattraction was absent in spinal cord explants derived from double STX1A/B KO embryos (Fig 7G, 7H and 7J).

Our previous studies have shown that exposition to Netrin-1 increases DCC surface expression in growth cones and that such increase is not diminished after blockade of STX1 [15,16]. Here we performed experiments to determine whether STX1 regulates Robo3 surface expression in the presence of Netrin-1. Mouse embryonic commissural neurons were cultured and stained for the differential immunolabeling of surface and intracellular Robo3 protein pools (S3 Fig). The data show that in control commissural growth cones, Robo3 trafficking and distribution is not substantially altered by Netrin-1 incubation. In contrast, STX1A/B knock-out growth cones incubated with Netrin-1 exhibited a decrease in surface Robo3 signals (S3D and S3E Fig). These findings suggest that the inactivation of STX1 alters Robo3 trafficking and/or surface expression, probably by increasing Robo3 internalization.

***Drosophila* Syx1A interacts genetically with the Slit/Robo and Netrin-1/DCC pathways**

During our analysis of midline guidance defects in *Syx1A* mutant embryos, we detected that the arrangement of the longitudinal fascicles was shifted towards the CNS midline compared to controls (Fig 8A and 8B; $n = 20$). In order to clarify whether the FasII-positive axonal fascicles were closer to the midline in *Syx1A* mutants, we quantified these distances at embryonic stage 16 and compared them to wt, *frazzled* (*fra*) and *robo2* mutants (Fig 8C–8E). Overall, *Syx1A* and *robo2* mutations induce a shift of FasII-positive fibres (both FasII-m and FasII-i) towards the midline. Regarding both FasII-m and FasII-i, the opposite occurs in *fra* mutant

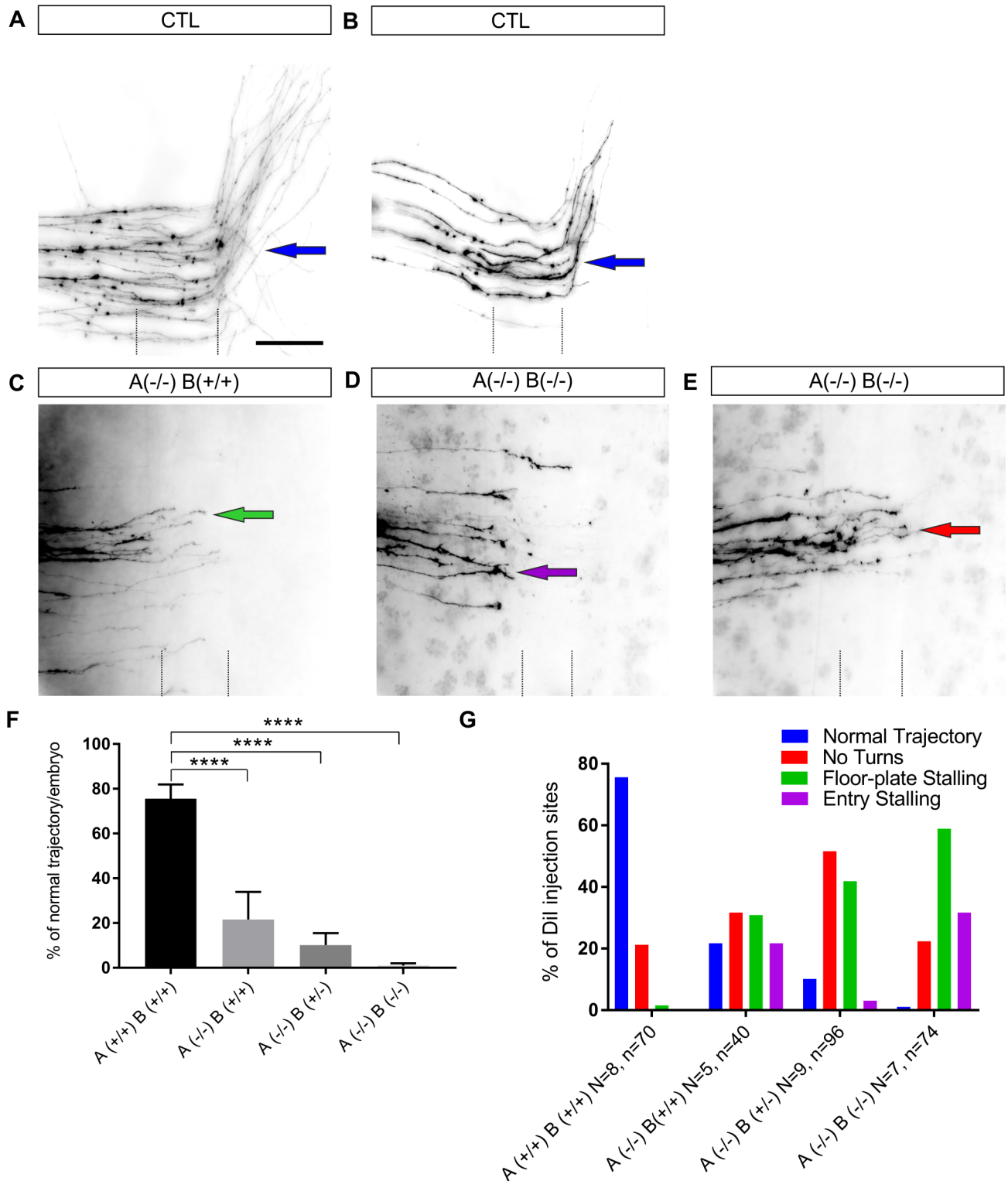


Fig 5. Commissural axon navigation in open-book preparations of mouse spinal cords. (A,B) Tracing of d11 commissural axons in open-book preparations of spinal cords dissected from E12 wild-type embryos revealed axonal extension towards the floor plate, midline crossing and rostral turning along the contralateral floor-plate border. In general, we found more labeled axons per DiI injection site in wild-type compared to mutant embryos. We added a second image from a wild-type embryo with fewer labeled axons (B) for direct comparison with the mutant embryos (C-E). (C) In mutant embryos lacking both alleles of STX1A, axons extended towards the midline but failed to enter or stalled within the floor plate (green arrow). Axons that manage to reach the contralateral floor-plate border mostly failed to turn. (D,E) These aberrant phenotypes were even seen more often in

double KO embryos. Furthermore, we also found more DiI injection sites where fibers failed to enter the floor-plate area in double KO embryos (G). (F) The quantitative analysis of normal trajectories in the different groups indicated significant differences between all mutant groups compared to wild-type mice: normal trajectories in wild-type at $75.6 \pm 5.9\%$ ($n = 8$, 70 injection sites) of the DiI injection sites compared to $21.7 \pm 11.1\%$ in $STX1A^{-/-}/STX1B^{+/+}$ ($n = 5$; 40 injection sites) and $10.2 \pm 5.4\%$ in $STX1A^{-/-}/STX1B^{+/-}$ ($n = 9$; 96 injection sites) mice. Only $1.0 \pm 0.9\%$ of the injection sites were normal in double knock-out mice ($n = 7$; 74 injection sites). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to wild-type. (G) The detailed analysis of the individual guidance steps demonstrated mainly floor-plate stalling (green arrows) and failure to turn rostrally into the longitudinal axis (red arrow) as navigation defects in mutant mice. At many injection sites axons were unable to enter the floor plate (purple arrow). Bar: 70 μm .

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007432.g005>

embryos, thereby suggesting that *Syx1A* interferes with a midline repression pathway (Fig 8A–8E) [44].

In order to address whether *Syx1A* is involved in the Slit/Robo pathway, we generated double mutants for *Syx1A* and *robo2* and examined the positioning of the longitudinal tracts in *robo2;Syx1A* embryos. As shown in Fig 8F–8J, the longitudinal fascicle distance to the midline decreased in the double mutant embryos (Fig 8I and 8P), where the strongest phenotypes showed a complete collapse of the tracts in the midline (Fig 8I, asterisk), as reported for *slit* (*sli*) mutants [45]. This result indicates that *Syx1A* and *robo2* interact genetically. In molecular terms, our above results suggest that *Syx1A* is involved in axonal repulsion in the midline.

In vertebrates, it has been reported that Netrin1/DCC axonal guidance is coupled to exocytosis through STX1 [15]. Therefore, we examined whether differences in *Syx1A* levels could affect the *Drosophila fra* axonal guidance phenotypes. We found that the *fra* mutant phenotype was significantly aggravated by removing one copy of *Syx1A* (Fig 8K–8O), thereby suggesting that *Syx1A* levels severely interfere with the Netrin/Fra guidance pathway.

Discussion

Here we used loss-of-function models in three species (fly, chick and mouse embryos) to examine the role of SNARE proteins in midline crossing of commissural axons. We report aberrant axonal phenotypes in the *D. melanogaster* midline and in the chicken spinal cord. Furthermore, we generated double mutant *STX1A/B* mice that show abnormal commissural phenotypes in the murine spinal cord. These findings indicate an evolutionarily conserved role of SNARE complex proteins in midline axonal guidance.

The guidance of commissural axons at the midline of the spinal cord is a complex process regulated by many molecules. For instance, the interaction between Netrin-1 and DCC attracts pre-crossing axons toward the floor plate [42,43]. Axon growth towards the floor plate is also altered in mice lacking VEGF/Flk1 signaling [46]. Midline crossing was shown to depend on attractive (Axonin-1/TAG1 with NrCAM; [47]) and repulsive interactions (Slit/Robo; [48]; Sema3B/NrCAM/PlexinA1/Neuropilin; [49] [50] [51,52]). The rostral turn of post-crossing commissural axons was shown to depend on morphogen gradients formed by Wnts [53,54] and Shh [55,56], although the latter is also involved in attraction of commissural axons toward the ventral midline in parallel to Netrin-1 [57,58]. In addition, an interaction between axonal Semaphorin6B and its ligand PlexinA2 [59] and interactions between the SynCAMs [60,61] are also involved in the turning of post-crossing commissural axons into the longitudinal axis.

Our results in *D. melanogaster* indicate that the SNARE complex is involved in midline axonal guidance. We show that *Ti-Vamp/Vamp7*, *nSyb*, and *Snap25* influence axonal guidance at the midline, but to a lesser extent than *Syx1A*. In general, these phenotypes may be incomplete *Drosophila* KOs, because in this fly there is a maternal contribution for all these components. Additionally, it is known that there is a high level of redundancy in *D. melanogaster*. In this regard, it has been reported that *Syb* can replace *nSyb* and *Snap24* can replace *Snap25* [40,41]. Regarding the *Syx1A* phenotypes, we can conclude that *Syx1A* loss of function induces commissural and ipsilateral axonal phenotypes. Interestingly, some of the phenotypes observed in

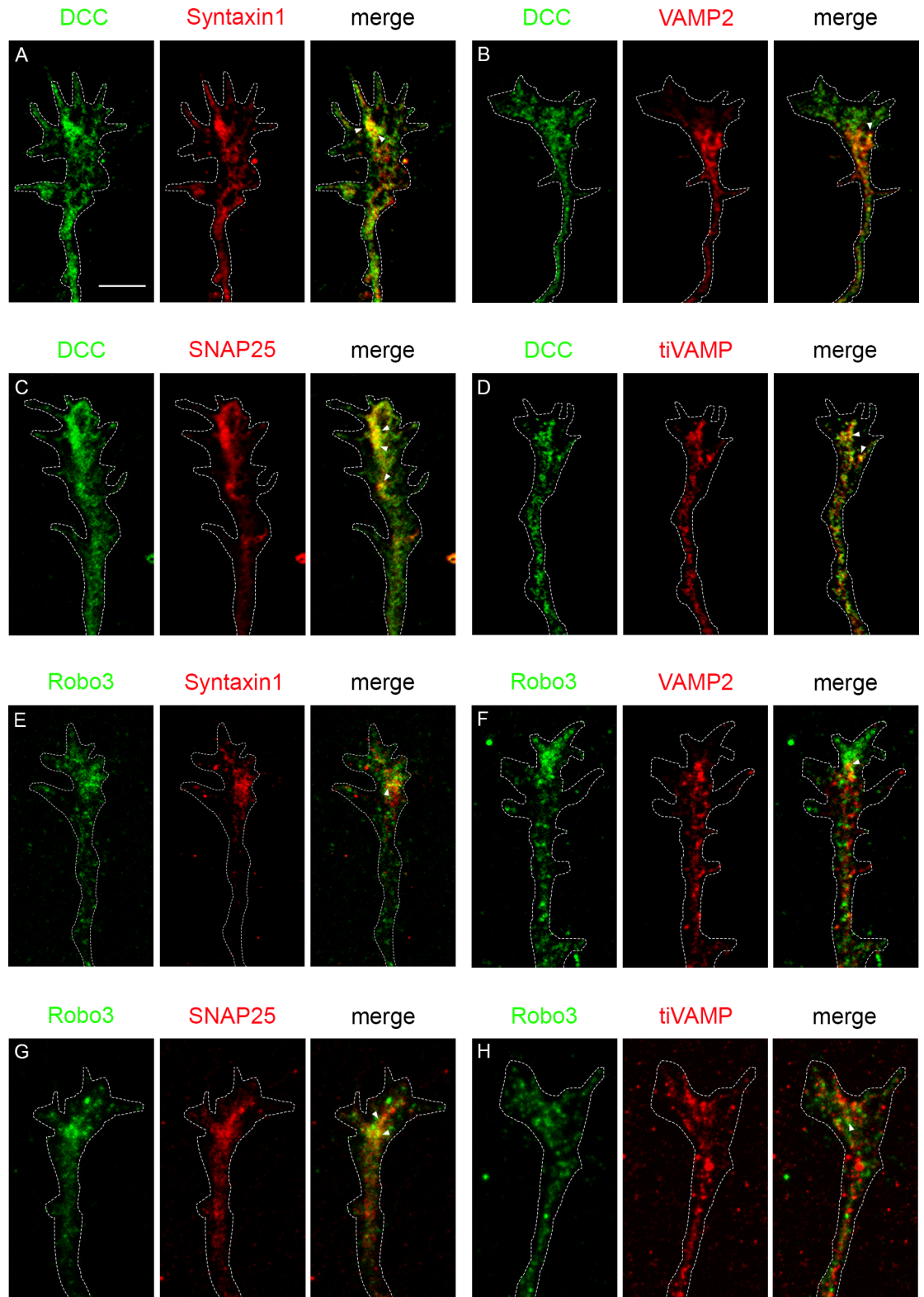


Fig 6. Colocalization of SNARE proteins and DCC/Robo3 in mouse commissural axons. Dissociated mouse commissural neurons were stained for different combinations of DCC and Robo3, and SNARE proteins (Syntaxin1, VAMP2, SNAP25 and Ti-VAMP). Analyses of confocal images from growth cones revealed partial colocalization between: (A) DCC and Syntaxin1; (B) DCC and VAMP2; (C) DCC and SNAP25; and (D) DCC and Ti-VAMP. Colocalization was also found between (E) Robo3 and

Syntaxin1; (F) Robo3 and VAMP2; (G) Robo3 and SNAP25; and (H) Robo3 and Ti-VAMP. Arrowheads point to areas of colocalization. Scale bar: 5 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007432.g006>

Syx1A mutants resemble the loss of function phenotypes of the Robo/Slit pathway [62,63]. We detected midline crosses of FasII-positive axons and a strong genetic interaction with *robo2*. These findings suggest that Syx1A is involved in repulsive midline guidance in *Drosophila*. In addition, most of the ipsilateral phenotypes detected are also common in *frazzled* (*fra*, the *D. melanogaster* homolog of DCC), and *fra* phenotypes are aggravated by decreased *Syx1A* levels. Furthermore, similar ipsilateral phenotypes to *Syx1A* are observed in *netrin* mutant ventral nerve cords [44], as well as in embryos mutant for Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs) [64] and Hh [65], thereby suggesting that Syx1A may participate in various guidance pathways in *D. melanogaster* not just in axonal guidance but also in fasciculation/defasciculation events. Recent studies suggest that whereas axonal attraction requires exocytosis, chemorepulsion relies on endocytosis [14,18,66,67]. In addition, SNARE proteins have been reported to be involved in both exo- and endocytosis [68]. Our genetic interaction experiments support the notion that Syx1A participates in both Netrin/Fra attraction and Slit/Robo repulsion.

The data obtained in chicken reinforce the idea that the silencing of SNARE proteins induces an overall increase in various commissural guidance defects, with the silencing of STX1A leading to defects in all the guidance steps analyzed. Silencing STX1A at E2, on day before neurons start to extend axons rather than E3, just before they start to extend axons, also resulted in axons failing to enter the midline area. This phenotype resembled previously reported findings on the role of STX1A in DCC-mediated guidance of pre-crossing commissural axons towards the midline [16].

Based on these results, we conclude that SNARE proteins make a crucial contribution to the navigation of chick commissural axons at the floor plate. SNARE proteins are involved in both attractive [16] and repulsive (this study) decision-making steps in axon guidance, as STX1A, VAMP2 and Ti-VAMP silencing leads to a substantial increase in pre-crossing and post-crossing phenotypes. These phenotypes are in agreement with those reported in previous studies [15,16], confirming the involvement of STX1 in the regulation of chemoattractive guidance pathways for commissural axons.

The phenotypes seen in the chicken spinal cord resemble those observed after silencing Calsyntenin-1 and RabGDI in dII neurons [69]. In the absence of Calsyntenin-1 and RabGDI, Robo1 is not transported to the growth cone surface, resulting in axonal stalling in the floor plate. Furthermore, silencing Calsyntenin-1, but not RabGDI, prevents the expression of the Wnt receptor Frizzled-3 on the growth cone surface, leading to failure of post-crossing axons to turn rostrally in response to the Wnt gradient [54]. These findings are consistent with the analyses of commissural axon navigation at the midline in STX1 KO mice. In double mutants, the absence of STX1A and STX1B proteins prevented midline crossing.

In Netrin-1 [70,71] and DCC KO [44,70] mice, pre-commissural fibers display strong phenotypes, including defasciculation, aberrant trajectories, and a complete failure to cross the floor plate. Weaker phenotypes have been observed in mouse mutants for other genes involved in commissural axonal guidance, including Sonic Hedgehog and the VEGF/FIK1 pathways [46,57]. The phenotype described here in STX1A/B mutant mice is reminiscent of, that in Netrin-1 and DCC KO mice, with fewer axons reaching the floor plate, lateral invasion of motorneuron territories, and fewer post-crossing commissural axons, although the phenotype is much weaker and many fibers still reach the ipsilateral floor-plate border. A likely explanation could be that although STX1A/B might be required for correct sensing of Netrin1/DCC guidance [15,16], compensatory mechanisms may derive from the possible lack of STX1A/B

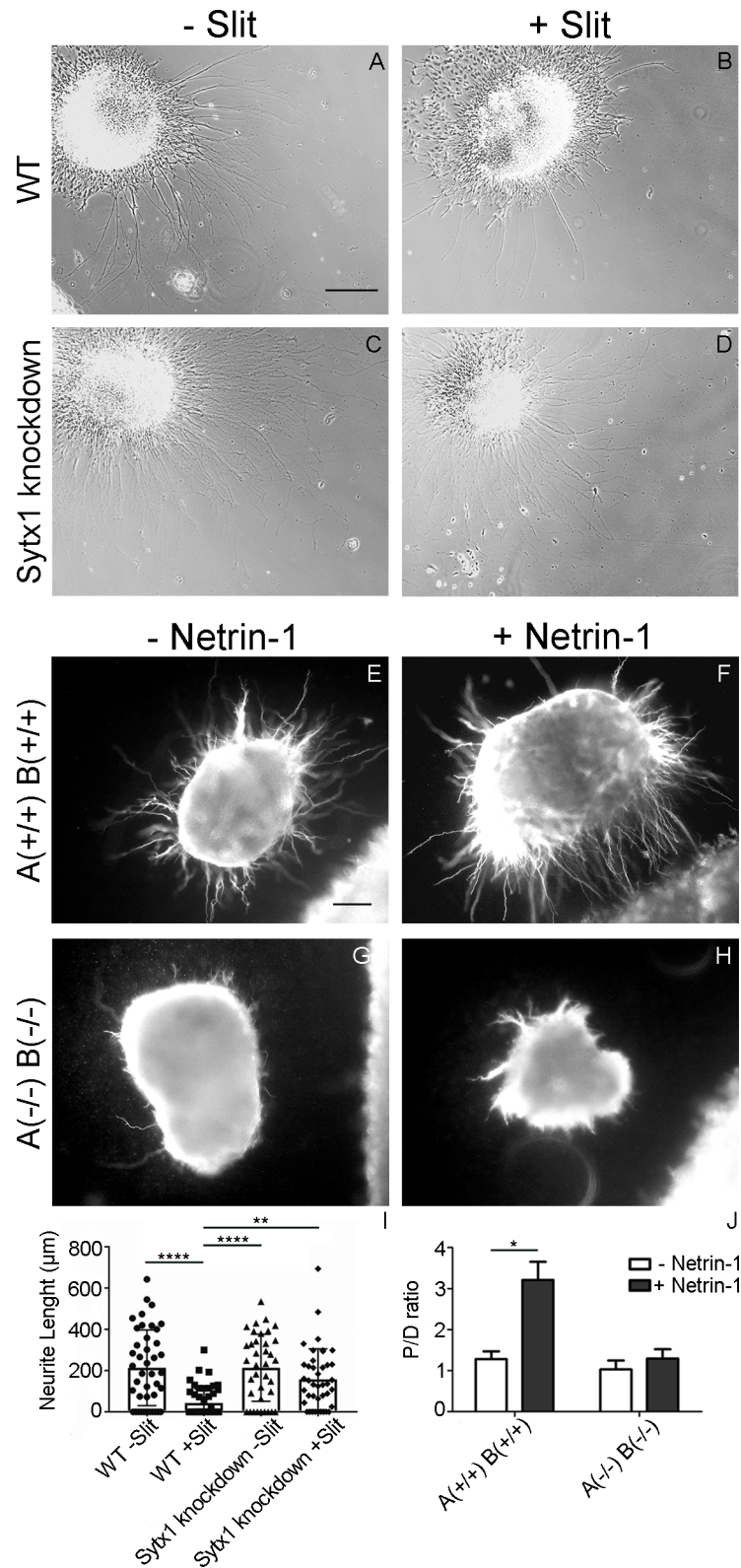


Fig 7. Syntaxin1A is required for axonal sensitivity to Slit-2 and Netrin-1. (A-D) Explants of dII1 neurons dissected from chick embryos grown on laminin substrate extend neurites readily in the absence of Slit-2 (A). In the presence of Slit-2, neurite length is strongly reduced (B). In contrast, neurite growth from explants taken from embryos

electroporated with dsRNA derived from STX1A did not differ in the absence (C) or presence (D) of Slit-2. Bar: 200 μm . (E-H) Dorsal spinal cord explants obtained from E11 wild-type and STX1A/B knock-out mouse embryos were confronted with HEK293T cells aggregates expressing or not Netrin-1. (E, F) Axons from wild-type explants showed a marked attraction when confronted to Netrin-1 expressing cell aggregates (F), in contrast to explants confronted with control cells which exhibited a radial axonal growth (E). Mutant spinal cord explants (STX1A(-/-)B(-/-)) exhibited a radial pattern of axonal growth in all conditions (G, H). Scale bar: 100 μm . (I) Plots showing average neurite lengths in explants of dl1 neurons incubated with Slit-2. Significant difference is exclusively seen in wild-type explants. (two-way ANOVA analysis; * $p < 0.05$, ** $p = 0.0011$, **** $p < 0.0001$). At least, 37 explants per condition were used for quantification. The average neurite length in control explants was 214 μm in the absence of Slit-2 (A,I; $n = 42$ explants) and 43 μm in the presence of Slit-2 (B,I; $n = 51$ explants). Explants taken from embryos after silencing STX1A extended neurites with an average length of 214 μm in the absence (C,I; $n = 37$) and 158 μm in the presence of Slit-2 (D,I; $n = 41$). J) Quantification of Proximal/Distal (P/D) ratios in spinal cord mouse explants confronted to Netrin-1 expressing cell aggregates (two-way ANOVA analysis; * $p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007432.g007>

requirement in other commissural attractive pathways (e.g., SHH or VEGF/Flk1). Our findings indicate that STX1A/B not only affects pre-crossing axons but strongly affects midline crossing and post-commissural axonal guidance. This conclusion is supported by our findings in *Drosophila*, which revealed a genetic interaction between *Syx1A* and the Robo pathway, as well as by the present in vitro experiments showing that STX1 is required for both Netrin-1 attraction and Slit-2 repulsion (Fig 7).

Our previous studies showed that the lack of STX1 did not affect DCC surface expression induced by Netrin-1 [15]. In the present study we show that the lack of STX1 results in a decreased surface expression of the Robo3 receptor in response to Netrin-1. It is therefore possible that the lack of STX1 may alter the surface expression of other Robo family members (eg Robo1) and Frizzled-3, the receptors used by post-crossing axons. This idea is supported by our STX1 loss-of-function data, showing that the lack of this SNARE protein abolished the responsiveness of post-crossing commissural axons to Slit, both in vitro (explant experiments) and in vivo (chick and mouse analyses). We thus propose that, in contrast to DCC expression, the effect of STX1 loss-of-function on post-crossing axons may be explained in part by preventing the surface expression of axon guidance receptors required for midline crossing and post-crossing navigation.

Robo3 is an atypical Robo receptor that has been proposed recently to potentiate DCC-mediated attraction to Netrin-1, but without binding Slits [72,73]. Thus, the observation that Netrin-1 in STX1-deficient growth cones results in decreased Robo3 surface expression, supports the notion of a possible contribution of Robo3 membrane downregulation to explain the reduced Netrin-1 chemoattraction found in STX1 loss-of-function models.

Many guidance molecules and their receptors involved in axonal guidance are conserved between vertebrates and invertebrates (e.g. Robo, Hh, and Netrins) [57,65,74]. Our systematic analysis of the phenotypes at the CNS midline of fly, chick, and mouse embryos mutant for STX1 unveils an evolutionarily conserved role for STX1 in midline axonal guidance. Overall, the ipsilateral phenotypes reported are consistent with the participation of STX1 in Netrin-1-dependent axonal guidance, as proposed previously [15,16]. In addition, here we describe post-commissural phenotypes that are reminiscent of those found in Robo, NrCAM and VEGF loss-of-function models [46,47,75,76], thereby suggesting that STX1 underlies various signaling pathways. Furthermore, the phenotypes described herein for other SNARE proteins point to the participation of SNAP25, VAMP2 and Ti-VAMP in midline axonal guidance, although the precise implication and relevance of individual SNARE proteins to specific axonal guidance signaling complexes remains to be determined. We propose that the coupling of the guidance receptor cell machinery to proteins that regulate exocytosis is a general and conserved mechanism linking chemotropic signaling to membrane trafficking [29].

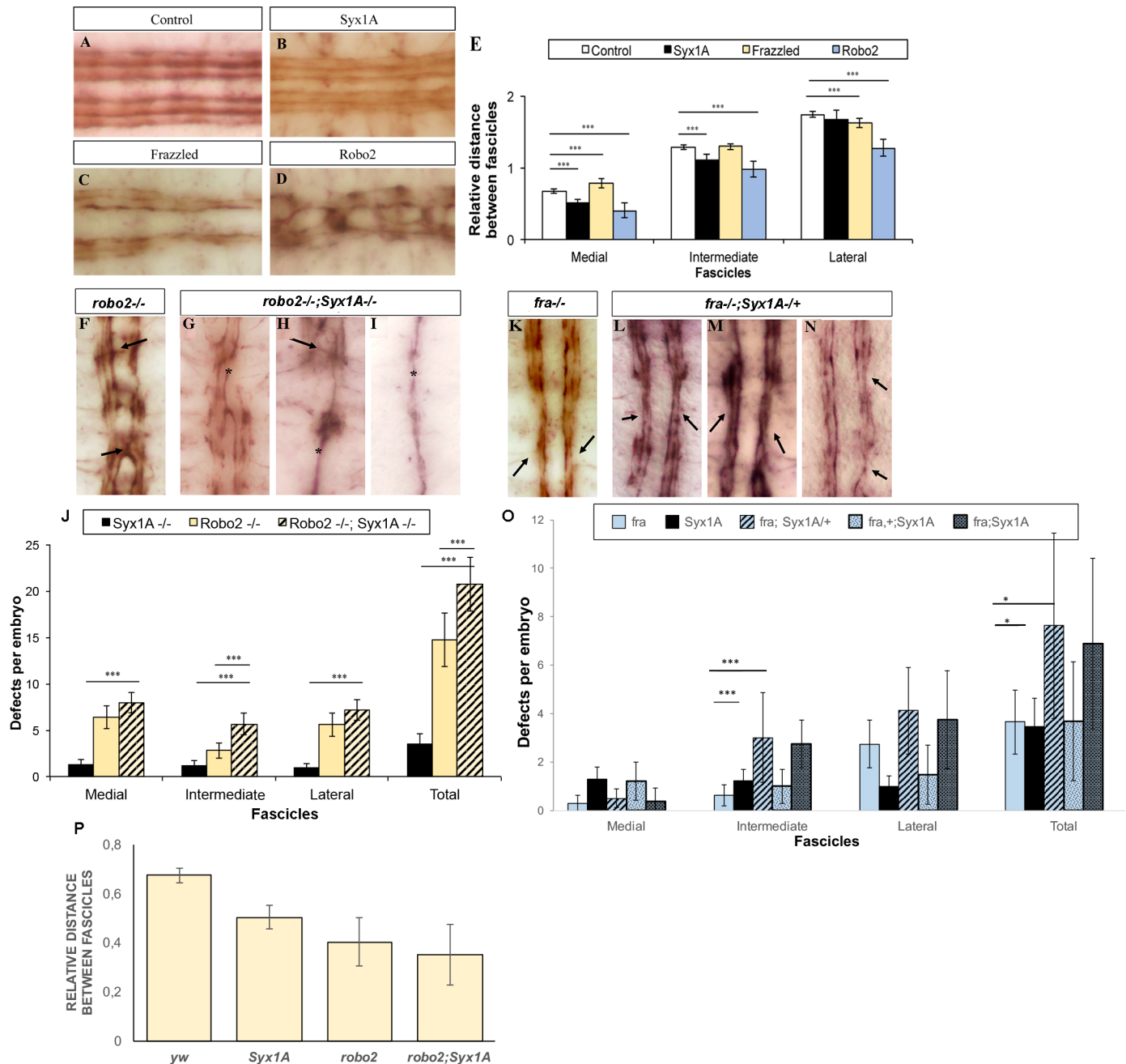


Fig 8. *Drosophila Syx1A* genetically interacts with *robo2* and *fra*. (A-D) Stage 16 embryos stained with anti-FasII to mark all FasII-positive axons. A, wt embryo showing the three FasII-positive longitudinal connectives. B, *Syx1A* mutant embryo showing the three longitudinal connectives closer to the midline. C, *fra*³ mutant embryo showing an increased distance between fascicles. D, *robo2* mutant embryo showing midline crosses and fascicles closer to the midline. (E) Quantification of the relative distance between fascicles in control (n = 20), *Syx1A* (n = 20), *fra* (n = 37) and *robo2* (n = 20) VNCs. Significant differences are labelled by asterisks (**p<0.01, ***p<0.001). (F-I) Stage 16 embryos stained with anti-FasII to mark all FasII-positive axons and to better observe axonal pathway defects. F, *robo2* mutant embryo showing midline crosses (arrows) and fascicle collapses. G-I, *robo2;Syx1A* double mutant embryos representative of the three phenotypes encountered; G: Weak, H: Intermediate and I: Strong. Asterisks show fascicle collapses in the VNC in all cases. Anterior is up. (J) Quantification of the total number of axon guidance defects encountered in *Syx1A* (n = 38), *robo2* (n = 39) and *robo2;Syx1A* (n = 31) mutant embryos. Significant differences are labelled by asterisks (**p<0.01, ***p<0.001). (K-N) Stage 16 embryos stained with anti-FasII to mark all FasII-positive axons and to better observe axonal pathway defects. K, *fra*³ mutant embryo showing fascicle defasciculation and collapse phenotypes (arrows). L-N, *fra;Syx1A/+* mutant embryos representative of the phenotypes encountered. Arrows point at defasciculation and collapsed phenotypes. (O) Quantification of the total number of axon guidance defects encountered in *fra* (n = 37), *Syx1A* (n = 31), *fra/+;Syx1A* (n = 15), *fra;Syx1A/+* (n = 8) and *fra;Syx1A* (n = 8) mutant embryos. Significant differences are labelled by asterisks (*p<0.05, ***p<0.001). (P) Quantification of the relative distance between medial fascicles in control (n = 20), *Syx1A* (n = 20), *robo2* (n = 20) and *robo2;Syx1A* (n = 17) VNCs. Only accounted the cases like panel G, where fascicles had not collapsed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007432.g008>

Materials and methods

D. melanogaster stocks and genetics

The following stocks are described in FlyBase (<http://flybase.org>): *Syx1A*^{A229}, SNAP-25 (Df(3L)1-16), *nSyb*^{d02894}, Ti-VAMP (P[CG1599^{G7738}]), *fra*³ and *robo2*. All alleles used are genetic nulls. Wild-type control is *yw*. *D. melanogaster* stocks and crosses were kept under standard conditions at 25°C.

Immunohistochemistry, image acquisition, and data analysis for all animal models

D. melanogaster embryos were staged as described by Campos-Ortega and Hartenstein [77] and stained following standard protocols. For immunostaining, embryos were fixed in 4% formaldehyde for 20 min. We used antibodies that recognize FasII (mAb1D4, DSHB), β Gal (Promega), Affinity-Purified Anti-HRP TRITC (Jackson ImmunoResearch), and mAbBP102 (DSHB). We used biotinylated HRP (Amersham) or non-biotinylated HRP (GE Healthcare), Alexa488, Alexa-555 and Alexa-647, Cy2, Cy3 and Cy5 conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch). For HRP histochemistry, the signal was amplified using the Vectastain-ABC kit (Vector Laboratories) when required. In addition, the signal for the DAB reaction was intensified with NiCl₂, except for double stainings, where it was omitted from one of the reactions. DIC photographs were taken using a Nikon Eclipse 80i microscope. Fluorescent images were obtained with a confocal microscope (Leica TCS-SPE-AOBS and TCS-SP2-AOBS systems) and processed using Fiji [78] and Adobe Photoshop. Images are maximum projections of confocal Z-sections.

Fertilized chicken eggs were obtained from a local supplier, and embryos were staged following Hamburger and Hamilton [79]. Electroporations were performed either at HH13-14 (E2) or at HH17-18 (E3). Images were acquired using a confocal spinning disk microscope (Olympus BX61).

Mouse embryos aged 11 or 12 days (E11 and E12 respectively) were used for the experiments. To obtain the tissue samples, pregnant female mice were sacrificed by cervical dislocation. A small portion of the tail was cut for further genotyping. Embryos were then fixed with 4% paraformaldehyde, and spinal cord sections were immunostained with mouse anti-TAG1 (mouse, Hybridoma Bank), followed by α -mouse IgM biotinylated (goat, Chemicon) and by Streptavidine Fluorescent FITC (490 nm, GE Healthcare). Sections were routinely stained with bisbenzimidazole. Confocal images were acquired using a Leica TCS SP5 microscope with 20x and 40x oil-immersion objectives. An average of 4–6 embryos per genotype and 10–15 slices per embryo were analyzed. For the quantification of TAG1 staining we used 4 KO and 3 WT embryos (32 sections from KO embryos and 8 from WT embryos). Data are presented as the means \pm SEM. Statistical significance was determined using two-tailed Student's *t*-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Embryonic mouse spinal cord sections were also stained with goat α -Robo3 antibodies (1:100, RD Systems) followed by incubation with α -goat Alexa-488 secondary antibodies.

Experiments with chicken embryos were approved by the Cantonal Veterinary Office Zurich. All the experiments using animals were performed in accordance with the European Community Council directive and the National Institute of Health guidelines for the care and use of laboratory animals. Experiments were also approved by the local ethical committees.

Quantification of fly axon guidance phenotypes

The percentage of axons displaying abnormal FasII phenotypes was quantified via anti-FasII stainings by an observer with no knowledge of the genotype. Defects were categorized as

“midline crossing”, “defasciculation” or “fiber collapse”. Due to the variability of fasciculations and occasional fiber collapses in wt embryos, we allowed for up to 2 of these defects to be considered “normal” or “background” and therefore set our “zero” defects at this control level. From 2 to 5 defects, we considered that embryos had a weak phenotype, while with more than 6 defects they were considered to have a strong phenotype.

The percentage of axons displaying abnormal midline crossing phenotypes was quantified via anti-HRP or BP102 stainings by an observer with no knowledge of the genotype. Defects were categorized as “fuzzy commissures”, “collapsed commissures” or “thinning of longitudinals”.

Fascicle distances to the midline were quantified via anti-FasII stainings, where the distance between fascicles was measured. Distances were measured in arbitrary units, between medial, intermediate and lateral fascicles and these values were normalized to the length of the axonal tracks in the VNC.

All data were analyzed statistically, SEMs were calculated and statistical significance assessed by Student’s t-test.

***In vivo* analysis of commissural axon pathfinding in chick embryos**

The analysis of commissural axon trajectories was performed as described previously [47,55]. In brief, fertilized eggs were windowed on the second or third day of incubation. Extra-embryonic membranes were removed to access the spinal cord *in ovo*. A plasmid encoding EGFP (20 ng/μl) and the dsRNA (250 ng/μl) derived from STX-1A, SNAP-25, VAMP2, or Ti-VAMP in PBS were injected into the central canal using glass capillaries. dsRNA was produced by *in vitro* transcription as described previously [80]. For the production of dsRNA derived from STX1A, SNAP25, VAMP2, or Ti-VAMP, we used ESTs obtained from Geneservices (now Source BioScience) [55]. For visualization and control of injection quality and quantity, 0.04% Trypan blue was added. For electroporation, we used platinum electrodes connected to a BTX square wave electroporator. Electrodes were positioned parallel to the longitudinal axis of the lumbosacral spinal cord of the chicken embryo, as detailed previously [55,81]. Five pulses of 26 V and 50 ms duration with a 1-s interpulse interval were applied. After electroporation, eggs were sealed with Scotch tape and incubated for another 2 or 3 days. The gene silencing specificity was verified by using two independent and non-overlapping sequences for the generation of the dsRNAs, when available. dsRNA sequences used in the present study were shown to downregulate the targeted proteins by 25%-66% [29]. Because in these conditions only about 60% of the cells are efficiently transfected, small decreases in the total amount of protein can still be indicative of efficient knock-down by dsRNA transfection.

For the analysis of commissural axon guidance, embryos were sacrificed between stages 25 and 26 [79]. The spinal cord was removed from the embryo, opened at the roof plate (“open-book” preparation), and fixed in 4% paraformaldehyde for 30–60 min. The trajectories of dII commissural axons at the lumbosacral level of the spinal cord were visualized by the application of the lipophilic dye Fast DiI (dissolved at 5 mg/ml in ethanol; Invitrogen) to the cell bodies. Care was taken to exclusively label the dorsal-most population of commissural neurons (dII neurons) to avoid confusion with more ventral populations that have distinct pathfinding behavior. Only DiI injection sites that were in the appropriate location in the dorsal-most part of the spinal cord and within the region expressing fluorescent protein were included in the analysis.

Quantification of the percentage of injection sites with axons displaying abnormal phenotypes was done by a person blind to the experimental condition. The injection sites were classified as ‘normal’ when the axons crossed the floor plate and turned rostrally along the contralateral floor-plate border. When at least 50% of the labeled fibers failed to reach the contralateral border of the floor plate, the DiI injection site was judged as ‘floor-plate stalling’.

when at least 50% of the fibers reaching the floor-plate exit site failed to turn into the longitudinal axis, the DiI injection site was considered to exhibit 'no turning'. Because stalling of all or most axons in the floor plate prevented the analysis of the turning phenotype, the quantification did not include a separate analysis of this phenotype between the different groups. In Fig 3G–3J, the average percentages of DiI injection sites per embryo with the respective aberrant phenotypes are shown.

Generation of Syntaxin 1B KO mice

Mutant STX1B mice were generated using a gene-trapping technique [82]. Mice (strain C57BL/6 from Charles River Laboratories) were cloned from an ES cell line (clone OST68841; Texas Institute for Genomic Medicine, TIGM). The ES cell clone contained an insertion of the Omnibank Vector VICTR24 in the first exon of the STX1B gene identified from the TIGM gene trap database and was microinjected into C57BL/6 host blastocysts to generate germline chimeras using standard procedures.

The retroviral OmniBank Vector VICTR24 (S1A Fig) contained a splice acceptor sequence (SA) followed by a 5' selectable marker β -GEO, a functional fusion between the β -galactosidase and neomycin resistance genes, for identification of successful gene trap events followed by a polyadenylation signal (pA). Insertion of the retroviral vector into STX1B led to the splicing of the endogenous upstream exons into this cassette to produce a fusion transcript that was used to generate a sequence tag (OST) of the trapped gene by 3' RACE [82]. More information on the gene trap strategies can be obtained from the TIGM website (<http://www.tigm.org/>). Chimeric mice were born three weeks later. Male chimeras were then mated with wt C57BL/6 to obtain germline transmission. We obtained four founders and used them to establish the colony. The derived F1 mice were screened by PCR. Genotyping of tail DNA was accomplished using PCR with forward and backward primers for the wt locus (5'-AAT CCG AAC AGA CTG AGA TAC ATT -3'; 5'-aGA GTT GGG CGG AAG GTA CAA GAG -3') and two primers for the LTR mutant locus (5'-ATA AAC CCT CTT GCA GTT GCA TC-3'; 5'-AAA TGG CGT TAC TTA AGC TAG CTT GC-3'). A 330-bp band was amplified for homozygous wt mice, a 270-bp and 200-bp band for homozygous mutant mice, and the three bands for heterozygous mice (S1A and S1B Fig). Western blot analyses demonstrated absence of STX1B protein in STX1B mutants (S1C Fig).

STX1A mutant mice were a kind gift from Thomas Sudhof [83]. STX1A and STX1B mutant mice were mated to produce double heterozygous mutant mice. The double heterozygous mutant mice were then mated with each other, and the genotypes of their offspring were determined by PCR.

Open-book preparations of mouse spinal cords were essentially done as described above for chicken embryos. Embryos were collected and dissected at E12. Spinal cords were removed, opened at the roof plate and pinned down in a Sylgard dish in 4% PFA for 20–50 minutes. Commissural axons were traced with Fast DiI (5 mg/ml in ethanol) by incubating the open-book preparations in PBS for at least 3 days before mounting in PBS between two 24x24 mm coverslips sealed with vacuum grease.

Ethics statement

Animal experimentation was conducted according to the European and National (Spanish) guidelines. The experimental protocol was approved by the local University Committee (CEEA-UB, Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona) and by the Catalan Government (Generalitat de Catalunya, Departament de Territori i Sostenibilitat) with the approval number #9431.

Immunoblots

Embryonic brains were lysed in hypotonic buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.2, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, and protease inhibitors (Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)).

SDS-sample buffer was added to the lysates, and the proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blot. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, which were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-HCl buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20, and incubated overnight at 4°C with mouse anti-STX1 (HPC-1 clone 1:500–1000, Sigma) and anti-actin (1:10000, Millipore) antibodies. After incubation with secondary antibodies, blots were developed following the ECL method (Amersham Pharmacia Biotech).

Dissociated neuronal cultures

Spinal cord dorsal neurons were isolated from E11 mouse embryos. After dissection of the alar plate, tissue was treated with Trypsin 1x for 3 minutes at 37°C and with DNase and Fetal Bovine Serum at 37°C for 10 minutes. 50000 cells were seeded on 200 mm² wells, previously treated with 0.5 mg/mL poly-D-lysine coverslips. Cells were maintained in vitro for 16–24 hours in Neurobasal medium with B27 1x, Glutamax 1x, Penicillin/Streptomycin 1x and Fetal Bovine Serum 10%. Neurons were fixed in 4% paraformaldehyde, and incubated with mouse anti-DCC (BD Pharmingen) and goat anti-Robo3 (RD Systems) antibodies (1:100). Mouse anti-STX1 (Sigma), mouse anti-VAMP2 (Synaptic Systems), mouse anti-SNAP25 (Covance); mouse anti-Ti-VAMP (Abcam) were incubated in blocking buffer to a final concentration of 1:100. Double immunodetection for DCC and SNARE proteins required incubation in blocking buffer containing anti-mouse IgG Fab specific antibodies. Alexa 488 anti-mouse and anti-goat secondary antibodies, and Alexa 568 anti-goat antibodies were incubated in blocking buffer (1:100). Neurons were imaged in a Leica TCS SP5 confocal microscope using a 63x oil-immersion objective.

To analyse Robo3 receptor surface expression, dorsal spinal cord neurons from wild-type and STX1A/B KO embryos were prepared as above. We followed the protocol described in [15]. Briefly, cultures were incubated with either 300 ng/ml of Netrin-1 (+Netrin-1) or with BSA (-Netrin-1) for 30 min at 37°C. After fixation, cultures were blocked with 10% of Normal Horse Serum (NHS) in PBS for 2 hours and incubated without detergent with primary goat anti-Robo3 (RD Systems, Robo3 1:100). Afterwards, cells were washed with PBS and incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor 488 anti-goat, 1:50) in excess to block all the primary antibody epitopes. After several washes in PBS, cells were blocked again with 10% NGS and incubated with goat anti-Robo3 primary antibody, in the presence of 0.3% Triton X-100. Cells were then washed and incubated with Alexa Fluor 568 anti-goat (both at 1:50, Jackson). Cells were washed, stained with DAPI and mounted in Mowiol. Cells were imaged in a Leica TCS SP5 microscope using a 63x oil-immersion objective. Z stacks of 8–12 confocal planes were acquired and images were processed with Fiji software. 20 growth cones per condition were analyzed with GraphPad software to quantify surface and inside receptor expression. Statistics were calculated with a two-way ANOVA and a Tukey's multiple comparison post-test, $p < 0.05$.

Explant cultures

Dorsal (alar plate) spinal cord explants were dissected from E11 mouse embryos. Tissue explants were co-cultured as described [16], along with cell aggregates of HEK293T cells stably transfected with a pCEP4-rNetrin-1c-myc construct or with control HEK293T cells. Explants and cell aggregates were embedded in a collagen matrix and maintained in vitro for 48h in Neurobasal supplemented media (Penicillin/Streptomycin 1x, Glutamax 1x and B27 1x).

Cultures were fixed with 4% paraformaldehyde and immunolabeled with mouse anti- β III-tubulin (1:1000, Covance) in blocking buffer. Images were acquired with an Eclipse E1000 microscope using a 10x objective. Axon elongation was quantified by calculating the area occupied by the axons in both the proximal and distal quadrants. Data was statistically analysed as above.

Explants of commissural neurons were dissected from untreated and experimental chicken embryos at HH25. Explants were cultured in serum-free DMEM medium with GlutaMax, 5 mg/ml Albumax, N3 and 1 mM sodium pyruvate. Eight-well Lab-Tek dishes (Nunc) were coated with polylysine (20 μ g/ml) and laminin (10 μ g/ml). After 24 h control medium or medium containing Slit-2 (100 ng/ml; R&D Systems) was added to the explants. After an additional 18 h, cultures were fixed in 4% PFA and the average neurite length of each explant was measured using the cellSens program (Olympus).

Supporting information

S1 Fig. Diagram of the generation of STX1B mutant mice. (A) Illustration of mutation in the STX1B is shown. The insertion is in the first intron of the gene. (B) Agarose gel illustrating genotyping bands for wt, heterozygous, and STX1B KO mice. (C) Western blot showing the absence of Syntaxin 1B protein in STX1B mutant mice but not in wt or heterozygous mice. Actin protein was used as loading control. (PDF)

S2 Fig. STX1A/B double mutant embryos show aberrant Robo3-immunolabeled commissural axons. E12 mouse spinal cords were immunostained with α -Robo3 antibodies to detect commissural axons; sections were counterstained with DAPI. Low magnification views (A,C) and enlarged views (B,D) are shown. In wt embryos Robo3-stained fibers form a tight bundle of axons directed towards the floor plate (A). In STX1A/B KO embryos Robo3-stained commissural fibers invade lateral domains of the ventral spinal cord (red arrowheads in C). In addition, many ipsilateral commissural fibers are tipped with growth cones in STX1A/B mutants (arrowheads in D). Consistently, the number of Robo3-stained contralateral fibers is decreased in STX1A/B knock-out embryos when compared to control embryos (arrows in A, C). Scale bar: 100 μ m (A), 50 μ m (B). (TIF)

S3 Fig. Robo3 surface expression in STX1A/B knock-out commissural neurons. Commissural neurons from E11 wild-type (A, B) and STX1A/B null mutant embryos were cultured (C, D) and incubated with recombinant Netrin-1 (B,D) or with control medium (A,C). Cultures were immunostained for the labeling of surface Robo3 receptor (green color) and the intracellular pool of Robo3 protein (red color). Analyses of the images suggested no major changes in wild-type growth cones incubated with Netrin-1 (A,B) and a slight increase in the intracellular Robo3 signal in STX1A/B knock-out growth cones treated with Netrin-1 (C,D). Quantification of outside/inside signals confirmed that incubation with Netrin-1 results in a significant increase (two-way ANOVA; $p < 0.05$ ** $p \leq 0.05$) of Robo3 intracellular signal in STX1A/B deficient growth cones (E). Scale bar: 5 μ m. (TIF)

Acknowledgments

We thank the Bloomington stock center for fly stocks and reagents. We thank the IRB Barcelona Advanced Digital Microscopy Facility for assistance and advice with confocal microscopy and software.

Author Contributions

Conceptualization: Esther T. Stoeckli, Sofia J. Araújo, Eduardo Soriano.

Investigation: Oriol Ros, Pablo José Barrecheguren, Tiziana Cotrufo, Martina Schaettin, Cristina Roselló-Busquets, Alba Vílchez-Acosta, Marc Hernaiz-Llorens, Ramón Martínez-Marmol, Fausto Ulloa, Esther T. Stoeckli, Sofia J. Araújo, Eduardo Soriano.

Methodology: Esther T. Stoeckli, Sofia J. Araújo, Eduardo Soriano.

Resources: Esther T. Stoeckli, Sofia J. Araújo, Eduardo Soriano.

Supervision: Esther T. Stoeckli, Sofia J. Araújo, Eduardo Soriano.

Validation: Esther T. Stoeckli, Sofia J. Araújo, Eduardo Soriano.

Visualization: Esther T. Stoeckli, Sofia J. Araújo, Eduardo Soriano.

Writing – original draft: Oriol Ros, Pablo José Barrecheguren, Tiziana Cotrufo, Esther T. Stoeckli, Sofia J. Araújo, Eduardo Soriano.

Writing – review & editing: Esther T. Stoeckli, Sofia J. Araújo, Eduardo Soriano.

References

1. Del Rio JA, Gonzalez-Billault C, Urena JM, Jimenez EM, Barallobre MJ, et al. (2004) MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr Biol* 14: 840–850. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.04.046> PMID: 15186740
2. Kolodkin AL, Tessier-Lavigne M (2011) Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
3. Nicol X, Hong KP, Spitzer NC (2011) Spatial and temporal second messenger codes for growth cone turning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13776–13781. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100247108> PMID: 21795610
4. Tcherkezian J, Brittis PA, Thomas F, Roux PP, Flanagan JG (2010) Transmembrane receptor DCC associates with protein synthesis machinery and regulates translation. *Cell* 141: 632–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.008> PMID: 20434207
5. Ly A, Nikolaev A, Suresh G, Zheng Y, Tessier-Lavigne M, et al. (2008) DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1. *Cell* 133: 1241–1254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.030> PMID: 18585357
6. Round J, Stein E (2007) Netrin signaling leading to directed growth cone steering. *Curr Opin Neurobiol* 17: 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.01.003> PMID: 17254765
7. Henley J, Poo MM (2004) Guiding neuronal growth cones using Ca²⁺ signals. *Trends Cell Biol* 14: 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.04.006> PMID: 15183189
8. Leung KM, van Horck FP, Lin AC, Allison R, Standart N, et al. (2006) Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nat Neurosci* 9: 1247–1256. <https://doi.org/10.1038/nn1775> PMID: 16980963
9. Chernyshova Y, Leshchynska I, Hsu SC, Schachner M, Sytnyk V (2011) The neural cell adhesion molecule promotes FGFR-dependent phosphorylation and membrane targeting of the exocyst complex to induce exocytosis in growth cones. *J Neurosci* 31: 3522–3535. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3109-10.2011> PMID: 21389209
10. Condeelis J, Singer RH, Segall JE (2005) The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 695–718. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120306> PMID: 16212512
11. Sabo SL, McAllister AK (2003) Mobility and cycling of synaptic protein-containing vesicles in axonal growth cone filopodia. *Nat Neurosci* 6: 1264–1269. <https://doi.org/10.1038/nn1149> PMID: 14608359
12. Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, et al. (2003) Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol* 5: 38–45. <https://doi.org/10.1038/ncb895> PMID: 12510192
13. Fujita A, Koinuma S, Yasuda S, Nagai H, Kamiguchi H, et al. (2013) GTP hydrolysis of TC10 promotes neurite outgrowth through exocytic fusion of Rab11- and L1-containing vesicles by releasing exocyst component Exo70. *PLoS One* 8: e79689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079689> PMID: 24223996

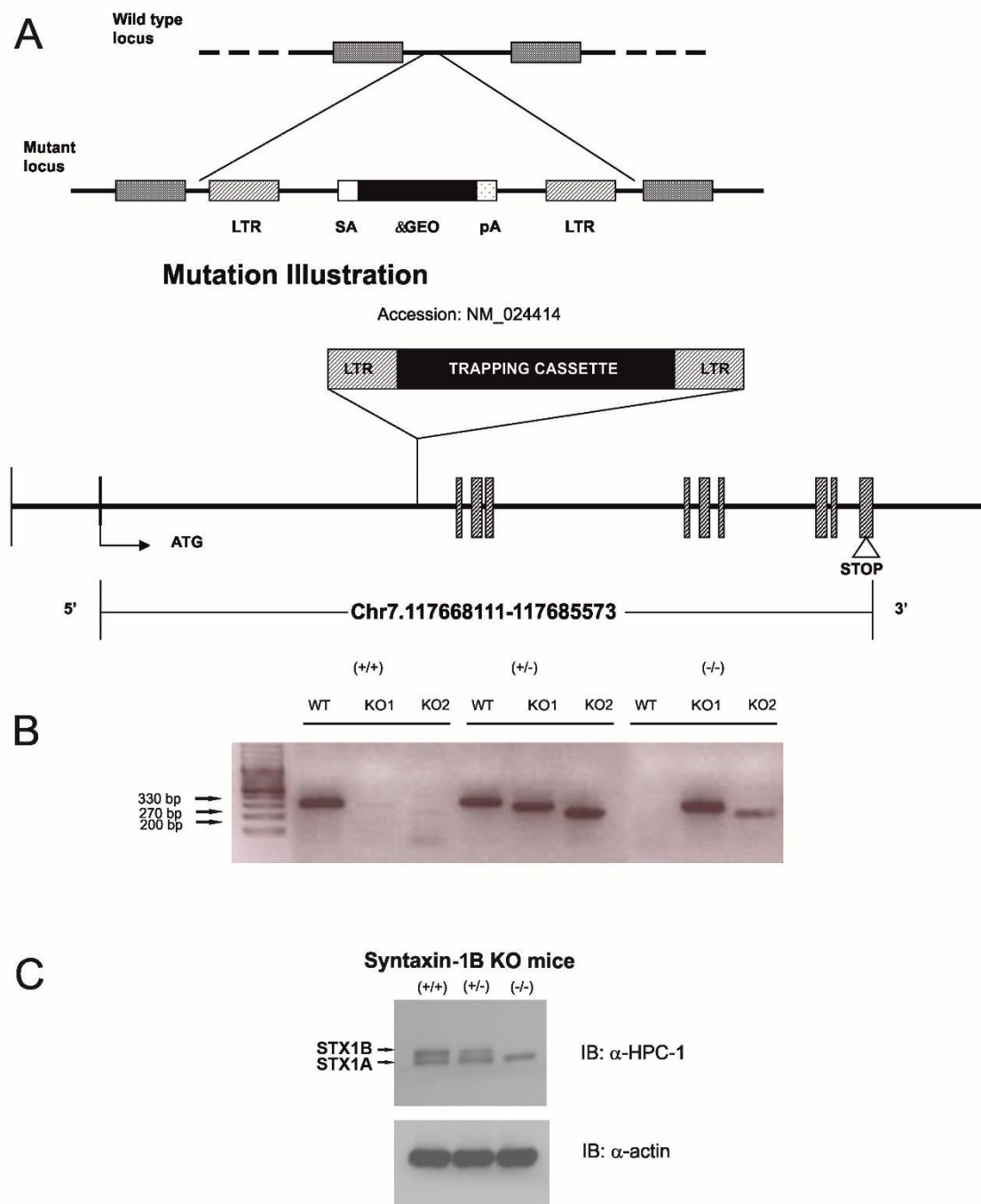
14. Tojima T, Itofusa R, Kamiguchi H (2014) Steering neuronal growth cones by shifting the imbalance between exocytosis and endocytosis. *Journal of Neuroscience* 21: 7165–7178.
15. Cotrufo T, Andres RM, Ros O, Perez-Branguli F, Muhaisen A, et al. (2012) Syntaxin 1 is required for DCC/Netrin-1-dependent chemoattraction of migrating neurons from the lower rhombic lip. *Eur J Neurosci* 36: 3152–3164. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08259.x> PMID: 22946563
16. Cotrufo T, Perez-Branguli F, Muhaisen A, Ros O, Andres R, et al. (2011) A signaling mechanism coupling netrin-1/deleted in colorectal cancer chemoattraction to SNARE-mediated exocytosis in axonal growth cones. *J Neurosci* 31: 14463–14480. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3018-11.2011> PMID: 21994363
17. Zylbersztein K, Petkovic M, Burgo A, Deck M, Garel S, et al. (2012) The vesicular SNARE Synaptobrevin is required for Semaphorin 3A axonal repulsion. *J Cell Biol* 196: 37–46. <https://doi.org/10.1083/jcb.201106113> PMID: 22213797
18. Ros O, Cotrufo T, Martinez-Marmol R, Soriano E (2015) Regulation of patterned dynamics of local exocytosis in growth cones by netrin-1. *J Neurosci* 35: 5156–5170. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0124-14.2015> PMID: 25834042
19. Tojima T, Akiyama H, Itofusa R, Li Y, Katayama H, et al. (2007) Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat Neurosci* 10: 58–66. <https://doi.org/10.1038/nn1814> PMID: 17159991
20. Martinez-Arca S, Alberts P, Zahraoui A, Louvard D, Galli T (2000) Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J Cell Biol* 149: 889–900. PMID: 10811829
21. Meldolesi J (2011) Neurite outgrowth: this process, first discovered by Santiago Ramon y Cajal, is sustained by the exocytosis of two distinct types of vesicles. *Brain Res Rev* 66: 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.06.004> PMID: 20600308
22. Osen-Sand A CM, Staple JK, Jones KA, Ayala G, Knowles J, Grenningloh G, Catsicas S. (1993) Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Nature* 364: 445–448. <https://doi.org/10.1038/364445a0> PMID: 8332215
23. Molnar Z, Lopez-Bendito G, Small J, Partridge LD, Blakemore C, et al. (2002) Normal development of embryonic thalamocortical connectivity in the absence of evoked synaptic activity. *J Neurosci* 22: 10313–10323. PMID: 12451131
24. Schoch S, Deak F, Konigstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, et al. (2001) SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* 294: 1117–1122. <https://doi.org/10.1126/science.1064335> PMID: 11691998
25. Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Mathews JR, et al. (2002) Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci* 5: 19–26. <https://doi.org/10.1038/nn783> PMID: 11753414
26. Danglot L, Zylbersztein K, Petkovic M, Gauberti M, Meziane H, et al. (2012) Absence of TI-VAMP/Vamp7 leads to increased anxiety in mice. *J Neurosci* 32: 1962–1968. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4436-11.2012> PMID: 22323709
27. Fujiwara T, Mishima T, Kofuji T, Chiba T, Tanaka K, et al. (2006) Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity. *J Neurosci* 26: 5767–5776. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0289-06.2006> PMID: 16723534
28. Wu YJ, Tejero R, Arancillo M, Vardar G, Korotkova T, et al. (2015) Syntaxin 1B is important for mouse postnatal survival and proper synaptic function at the mouse neuromuscular junctions. *J Neurophysiol* 114: 2404–2417. <https://doi.org/10.1152/jn.00577.2015> PMID: 26203110
29. Barrecheguren PJ, Ros O, Cotrufo T, Kunz B, Soriano E, et al. (2016) SNARE proteins play a role in motor axon guidance in vertebrates and invertebrates. *Dev Neurobiol*.
30. DiAntonio A, Burgess RW, Chin AC, Deitcher DL, Scheller RH, et al. (1993) Identification and characterization of *Drosophila* genes for synaptic vesicle proteins. *J Neurosci* 13: 4924–4935. PMID: 8229205
31. Risinger C, Deitcher DL, Lundell I, Schwarz TL, Larhammar D (1997) Complex gene organization of synaptic protein SNAP-25 in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 194: 169–177. PMID: 9272858
32. Littleton JT, Chapman ER, Kreber R, Garment MB, Carlson SD, et al. (1998) Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly. *Neuron* 21: 401–413. PMID: 9728921
33. Schulze KL, Broadie K, Perin MS, Bellen HJ (1995) Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. *Cell* 80: 311–320. PMID: 7834751

34. Cerezo JR, Jiménez F, Moya F (1995) Characterization and gene cloning of *Drosophila* syntaxin 1 (Dsynt1): the fruit fly homologue of rat syntaxin 1. *Brain Res Mol Brain Res* 29: 245–252. PMID: [7609612](#)
35. Moussian B, Veerkamp J, Müller U, Schwarz H (2007) Assembly of the *Drosophila* larval exoskeleton requires controlled secretion and shaping of the apical plasma membrane. *Matrix Biol* 26: 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.02.001> PMID: [17360167](#)
36. Broadie K, Prokop A, Bellen HJ, O’Kane CJ, Schulze KL, et al. (1995) Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in *Drosophila*. *Neuron* 15: 663–673. PMID: [7546745](#)
37. Burgess RW, Deitcher DL, Schwarz TL (1997) The synaptic protein syntaxin1 is required for cellularization of *Drosophila* embryos. *J Cell Biol* 138: 861–875. PMID: [9265652](#)
38. Schulze KL, Bellen HJ (1996) *Drosophila* syntaxin is required for cell viability and may function in membrane formation and stabilization. *Genetics* 144: 1713–1724. PMID: [8978057](#)
39. Kolodziej PA, Timpe LC, Mitchell KJ, Fried SR, Goodman CS, et al. (1996) frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87: 197–204. PMID: [8861904](#)
40. Bhattacharya S, Stewart BA, Niemeyer BA, Burgess RW, McCabe BD, et al. (2002) Members of the synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) family in *Drosophila* are functionally interchangeable in vivo for neurotransmitter release and cell viability. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13867–13872. <https://doi.org/10.1073/pnas.202335999> PMID: [12364587](#)
41. Vilinsky I, Stewart BA, Drummond J, Robinson I, Deitcher DL (2002) A *Drosophila* SNAP-25 null mutant reveals context-dependent redundancy with SNAP-24 in neurotransmission. *Genetics* 162: 259–271. PMID: [12242238](#)
42. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, et al. (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87: 1001–1014. PMID: [8978605](#)
43. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, et al. (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386: 796–804. <https://doi.org/10.1038/386796a0> PMID: [9126737](#)
44. Bhat KM (2005) Slit-roundabout signaling neutralizes netrin-Frazzled-mediated attractant cue to specify the lateral positioning of longitudinal axon pathways. *Genetics* 170: 149–159. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.036863> PMID: [15716500](#)
45. Kidd T, Bland KS, Goodman CS (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96: 785–794. PMID: [10102267](#)
46. Ruiz de Almodovar C, Fabre PJ, Knevels E, Coulon C, Segura I, et al. (2011) VEGF mediates commissural axon chemoattraction through its receptor Flk1. *Neuron* 70: 966–978. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.014> PMID: [21658588](#)
47. Stoeckli ET, Landmesser LT (1995) Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14: 1165–1179. PMID: [7541632](#)
48. Philipp M, Niederkofler V, Debrunner M, Alther T, Kunz B, et al. (2012) RabGDI controls axonal midline crossing by regulating Robo1 surface expression. *Neural Dev* 7: 36. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-36> PMID: [23140504](#)
49. Zou Y, Stoeckli E, Chen H, Tessier-Lavigne M (2000) Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* 102: 363–375. PMID: [10975526](#)
50. Nawabi H, Briancon-Marjollet A, Clark C, Sanyas I, Takamatsu H, et al. (2010) A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes Dev* 24: 396–410. <https://doi.org/10.1101/gad.542510> PMID: [20159958](#)
51. Charoy C, Nawabi H, Reynaud F, Derrington E, Bozon M, et al. (2012) gdnf activates midline repulsion by Semaphorin3B via NCAM during commissural axon guidance. *Neuron* 75: 1051–1066. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.021> PMID: [22998873](#)
52. Delloye-Bourgeois C, Jacquier A, Charoy C, Reynaud F, Nawabi H, et al. (2015) PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments. *Nat Neurosci* 18: 36–45. <https://doi.org/10.1038/nn.3893> PMID: [25485759](#)
53. Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, et al. (2003) Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 302: 1984–1988. <https://doi.org/10.1126/science.1089610> PMID: [14671310](#)
54. Domanitskaya E, Wacker A, Mauti O, Baeriswyl T, Esteve P, et al. (2010) Sonic hedgehog guides post-crossing commissural axons both directly and indirectly by regulating Wnt activity. *J Neurosci* 30: 11167–11176. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1488-10.2010> PMID: [20720124](#)

55. Bourikas D, Pekarik V, Baeriswyl T, Grunditz A, Sadhu R, et al. (2005) Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat Neurosci* 8: 297–304. <https://doi.org/10.1038/nn1396> PMID: 15746914
56. Wilson NH, Stoeckli ET (2013) Sonic hedgehog regulates its own receptor on postcrossing commissural axons in a glypican1-dependent manner. *Neuron* 79: 478–491. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.025> PMID: 23931997
57. Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M (2003) The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113: 11–23. PMID: 12679031
58. Yam PT, Langlois SD, Morin S, Charron F (2009) Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* 62: 349–362. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.022> PMID: 19447091
59. Andermatt I, Wilson N, Bergmann T, Mauti O, Gesemann M, et al. (2014) Semaphorin 6B acts as a receptor in post-crossing commissural axon guidance. *Development* 141: 3709–3720. <https://doi.org/10.1242/dev.112185> PMID: 25209245
60. Niederkofler V, Baeriswyl T, Ott R, Stoeckli ET (2010) Nectin-like molecules/SynCAMs are required for post-crossing commissural axon guidance. *Development* 137: 427–435. <https://doi.org/10.1242/dev.042515> PMID: 20056680
61. Frei JA, Andermatt I, Gesemann M, Stoeckli ET (2014) The SynCAM synaptic cell adhesion molecules are involved in sensory axon pathfinding by regulating axon-axon contacts. *J Cell Sci* 127: 5288–5302. <https://doi.org/10.1242/jcs.157032> PMID: 25335893
62. Kidd T, Russell C, Goodman CS, Tear G (1998) Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* 20: 25–33. PMID: 9459439
63. Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10: 409–426. PMID: 8461134
64. Smart AD, Course MM, Rawson J, Selleck S, Van Vactor D, et al. (2011) Heparan sulfate proteoglycan specificity during axon pathway formation in the *Drosophila* embryo. *Devel Neurobio* 71: 608–618.
65. Ricolo D, Butí E, Araújo SJ (2015) *Drosophila melanogaster* Hedgehog cooperates with Frazzled to guide axons through a non-canonical signalling pathway. *Mechanisms of Development*.
66. Tojima T, Kamiguchi H (2015) Exocytic and endocytic membrane trafficking in axon development. *Develop Growth Differ* 57: 291–304.
67. Chance RK, Bashaw GJ (2015) Slit-Dependent Endocytic Trafficking of the Robo Receptor Is Required for Son of Sevenless Recruitment and Midline Axon Repulsion. *PLoS Genet* 11: e1005402. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005402> PMID: 26335920
68. Wu L-G, Hamid E, Shin W, Chiang H-C (2014) Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol* 76: 301–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170305> PMID: 24274740
69. Alther TA, Domanitskaya E, Stoeckli ET (2016) Calsyntenin 1-mediated trafficking of axon guidance receptors regulates the switch in axonal responsiveness at a choice point. *Development* 143: 994–1004. <https://doi.org/10.1242/dev.127449> PMID: 26839361
70. Bin JM, Han D, Lai Wing Sun K, Croteau LP, Dumontier E, et al. (2015) Complete Loss of Netrin-1 Results in Embryonic Lethality and Severe Axon Guidance Defects without Increased Neural Cell Death. *Cell Rep* 12: 1099–1106. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.028> PMID: 26257176
71. Yung AR, Nishitani AM, Goodrich LV (2015) Phenotypic analysis of mice completely lacking netrin 1. *Development* 142: 3686–3691. <https://doi.org/10.1242/dev.128942> PMID: 26395479
72. Jaworski A, Tom I, Tong RK, Gildea HK, Koch AW, et al. (2015) Operational redundancy in axon guidance through the multifunctional receptor Robo3 and its ligand NELL2. *Science* 350: 961–965. <https://doi.org/10.1126/science.aad2615> PMID: 26586761
73. Friocourt F, Chédotal A (2017) The Robo3 receptor, a key player in the development, evolution, and function of commissural systems. *Developmental Neurobiology* 77: 876–890. <https://doi.org/10.1002/dneu.22478> PMID: 28033646
74. Araújo SJ, Tear G (2003) Axon guidance mechanisms and molecules: lessons from invertebrates. *Nat Rev Neurosci* 4: 910–922. <https://doi.org/10.1038/nrn1243> PMID: 14595402
75. Long H, Sabatier C, Ma L, Plump A, Yuan W, et al. (2004) Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42: 213–223. PMID: 15091338
76. Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Fazeli A, et al. (1997) Guidance of developing axons by netrin-1 and its receptors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62: 467–478. PMID: 9598381

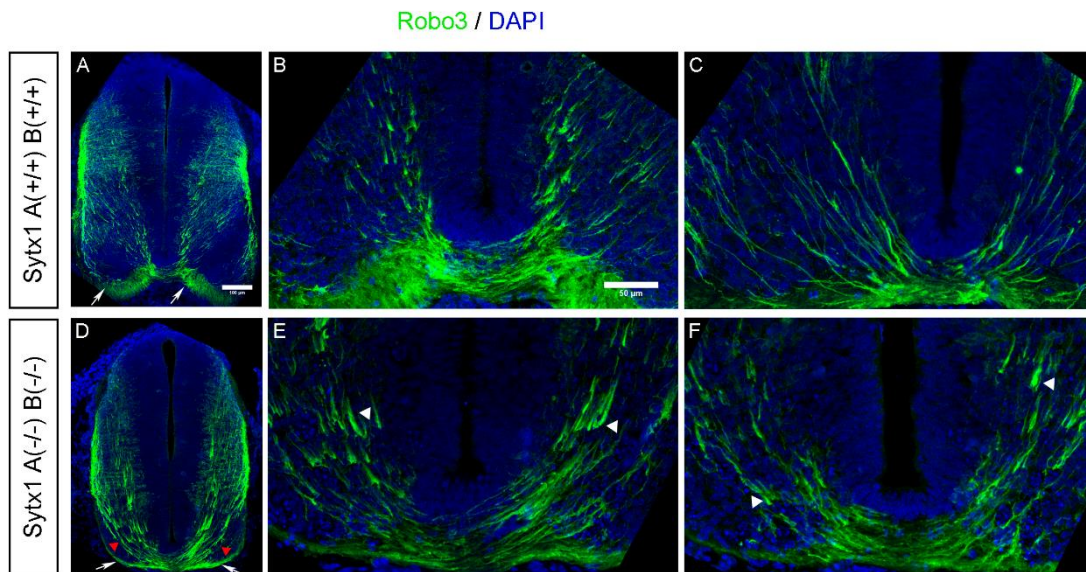
77. Campos-Ortega AJ, Hartenstein V (1985) *The Embryonic Development of Drosophila Melanogaster*. Springer-Verlag New York: 10–84.
78. Schindelin J A-CI, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019> PMID: [22743772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22743772/)
79. Hamburger V, Hamilton HL (1992) A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 195: 231–272. <https://doi.org/10.1002/aja.1001950404> PMID: [1304821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1304821/)
80. Pekarik V, Bourikas D, Miglino N, Joset P, Preiswerk S, et al. (2003) Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat Biotechnol* 21: 93–96. <https://doi.org/10.1038/nbt770> PMID: [12496763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12496763/)
81. Perrin FE, Stoeckli ET (2000) Use of lipophilic dyes in studies of axonal pathfinding in vivo. *Microsc Res Tech* 48: 25–31. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(20000101\)48:1<25::AID-JEMT4>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(20000101)48:1<25::AID-JEMT4>3.0.CO;2-F) PMID: [10620782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10620782/)
82. Durick K, Mendlein J, Xanthopoulos KG (1999) Hunting with traps: genome-wide strategies for gene discovery and functional analysis. *Genome Research* 9: 1019–1025. PMID: [10568742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10568742/)
83. Gerber SH, Rah J-C, Min S-W, Liu X, de Wit H, et al. (2008) Conformational Switch of Syntaxin-1 Controls Synaptic Vesicle Fusion. *Science* 321: 1507–1510. <https://doi.org/10.1126/science.1163174> PMID: [18703708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18703708/)

SUPPORTING INFORMATION



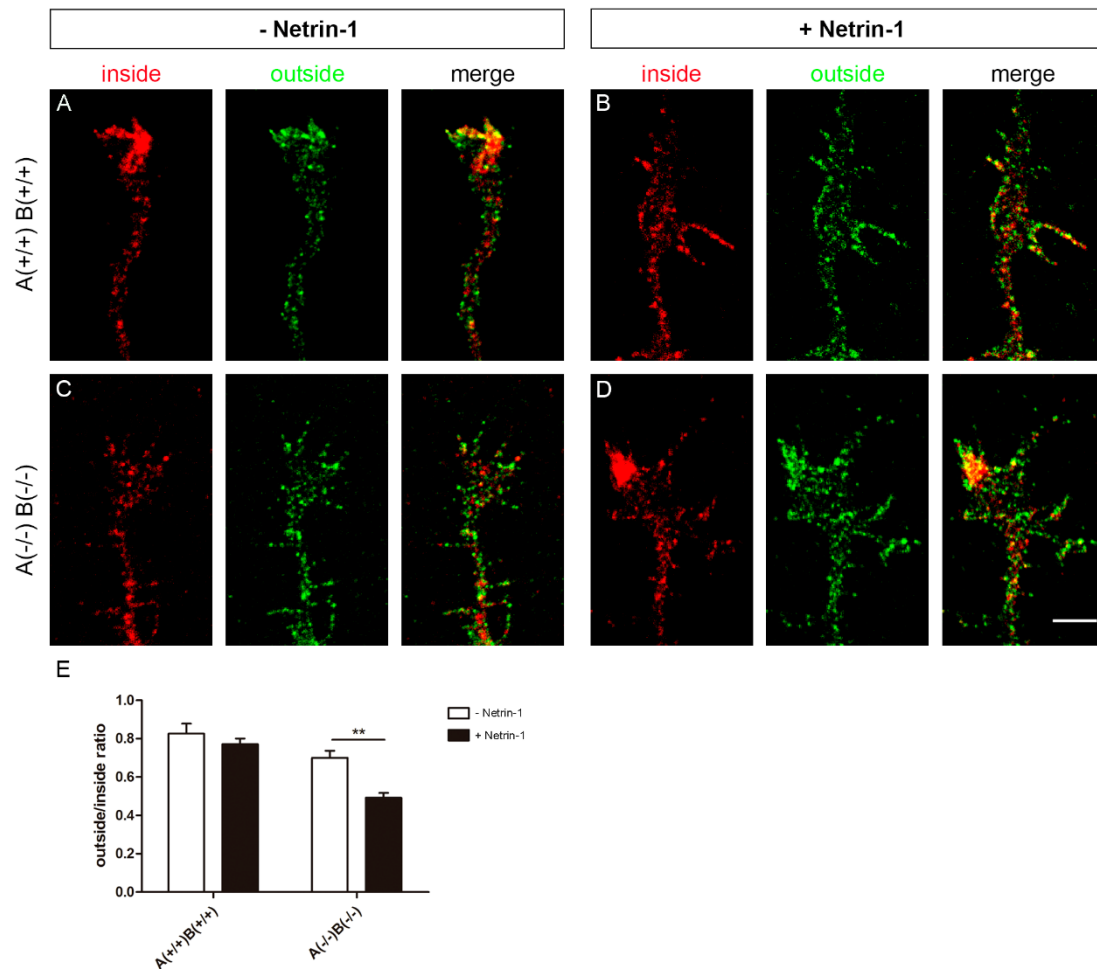
S1.Fig. Diagram of the generation of STX1B mutant mice.

(A) Illustration of mutation in the STX1B is shown. The insertion is in the first intron of the gene. (B) Agarose gel illustrating genotyping bands for wt, heterozygous, and STX1B KO mice. (C) Western blot showing the absence of Syntaxin 1B protein in STX1B mutant mice but not in wt or heterozygous mice. Actin protein was used as loading control.



S2.Fig. STX1A/B double mutant embryos show aberrant Robo3-immunolabeled commissural axons.

E12 mouse spinal cords were immunostained with α -Robo3 antibodies to detect commissural axons; sections were counterstained with DAPI. Low magnification views (A,C) and enlarged views (B,D) are shown. In wt embryos Robo3-stained fibers form a tight bundle of axons directed towards the floor plate (A). In STX1A/B KO embryos Robo3-stained commissural fibers invade lateral domains of the ventral spinal cord (red arrowheads in C). In addition, many ipsilateral commissural fibers are tipped with growth cones in STX1A/B mutants (arrowheads in D). Consistently, the number of Robo3-stained contralateral fibers is decreased in STX1A/B knockout embryos when compared to control embryos (arrows in A,C). Scale bar: 100 μ m (A), 50 μ m (B).



S3.Fig. Robo3 surface expression in STX1A/B knock-out commissural neurons.

Commissural neurons from E11 wild-type (A, B) and STX1A/B null mutant embryos were cultured (C, D) and incubated with recombinant Netrin-1 (B,D) or with control medium (A,C). Cultures were immunostained for the labeling of surface Robo3 receptor (green color) and the intracellular pool of Robo3 protein (red color). Analyses of the images suggested no major changes in wild-type growth cones incubated with Netrin-1 (A,B) and a slight increase in the intracellular Robo3 signal in STX1A/B knock-out growth cones treated with Netrin-1 (C,D). Quantification of outside/inside signals confirmed that incubation with Netrin-1 results in a significant increase (two-way ANOVA; $p < 0.05$ ** $p \leq 0,05$) of Robo3 intracellular signal in STX1A/B deficient growth cones (E). Scale bar: 5 μ m.

Cholesterol Depletion Regulates Axonal Growth and Enhances Central and Peripheral Nerve Regeneration

Cristina Roselló-Busquets^{1,2}, Natalia de la Oliva, Ramón Martínez-Marmol^{1,2,+}, Marc Hernaiz-Llorens^{1,2}, Marta Pascual, Ashraf Muhaisen, Xavier Navarro, Jaume del Valle and Eduardo Soriano^{1,2,7,8,*}

- (1) Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia i Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya.
- (2) Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa sobre Malalties Neurodegeneratives (CIBERNED), ISCIII, Madrid, Espanya.
- (3) Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Espanya.
- (4) Institut de Recerca de la Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona, Espanya.
- (5) Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Espanya.
- (+) Adreça actual: Centre Clem Jones per la Recerca de la demència associada a l'envelliment, Institut Queensland Brain, Brisbane, Queensland, Austràlia.

Resum

El creixement normal dels axons durant el desenvolupament i la regeneració depèn de l'acció de multitud de receptors i dels complexos de senyalització, molt d'ells localitzats en microdominis de membrana especialitzats, anomenats *lipid rafts*, que tenen una composició lipídica particular. El colesterol es el component majoritari dels *lipid rafts* i la integritat d'aquestes estructures depèn de les concentracions presents d'aquesta molècula. En aquest estudi busquem l'efecte que té eliminar el colesterol de la membrana sobre les neurones que s'estan desenvolupant i els axons que estan regenerant. Primer, demostrem que la disminució del colesterol *in vitro* en neurones en desenvolupament provinents del SNC i del SNP incrementa la mida dels conus de creixement, la densitat dels fil·lopodis i el nombre de punts de ramificació de les neurites.

Després, demostrem que l'eliminació del colesterol incrementa la regeneració dels axons després de seccionar-los *in vitro* en una cambra de microfluids utilitzant cultius disgregats de neurones d'hipocamp i amb cultius organotípics d'escorça entorrinal i d'hipocamp, utilitzant la via perforant com a model d'estudi de regeneració del SNC. Per últim, a través d'experiments d'axotomia del nervi ciàtic, demostrem que l'eliminació del colesterol també afavoreix la regeneració del SNP *in vivo*. Cal destacar que l'increment de regeneració observat als axons perifèrics està recolzat amb electrofisiologia, on veiem respostes més ràpid, cosa que indica una recuperació funcional després de la regeneració. Resumint, els nostres resultats indiquen que la disminució del colesterol *per se* és capaç de promoure el creixement dels axons en desenvolupament i d'incrementar la regeneració *in vitro* i *in vivo* tant del SNC com del SNP.

Aquest article ha estat publicat a la revista FRONTIERS IN CELLULAR NEUROSCIENCE, 12 Febrer 2019; 13:40

Rosello-Busquets, C., de la Oliva, N., Martinez-Marmol, R., Hernaiz-Llorens, M., Pascual, M., Muhaisen, A., et al. (2019). Cholesterol Depletion Regulates Axonal Growth and Enhances Central and Peripheral Nerve Regeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 40. doi:10.3389/fncel.2019.00040.



Cholesterol Depletion Regulates Axonal Growth and Enhances Central and Peripheral Nerve Regeneration

Cristina Roselló-Busquets^{1,2†}, Natalia de la Oliva^{2,3†}, Ramón Martínez-Mármol^{1,2†‡}, Marc Hernaiz-Llorens^{1,2}, Marta Pascual^{1,2,4}, Ashraf Muhaisen^{1,2,4}, Xavier Navarro^{2,3}, Jaume del Valle^{2,3*} and Eduardo Soriano^{1,2,4,5*}

¹ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Institute of Neurosciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ² Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ³ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Institute of Neurosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain, ⁴ Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona, Spain, ⁵ ICREA Academia, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Stefania Raimondo,
University of Turin, Italy

Reviewed by:

Mehmet Emin Onger,
Ondokuz Mayıs University, Turkey
Petr Dubový,
Masaryk University, Czechia

*Correspondence:

Jaume del Valle
jaume.delvalle@gmail.com
Eduardo Soriano
esoriano@ub.edu

† These authors have contributed
equally to this work

‡Present address:

Ramón Martínez-Mármol,
Clem Jones Centre for Ageing
Dementia Research, Queensland
Brain Institute, The University
of Queensland, Brisbane,
QLD, Australia

Received: 05 October 2018

Accepted: 25 January 2019

Published: 12 February 2019

Citation:

Roselló-Busquets C,
de la Oliva N, Martínez-Mármol R,
Hernaiz-Llorens M, Pascual M,
Muhaisen A, Navarro X, del Valle J
and Soriano E (2019) Cholesterol
Depletion Regulates Axonal Growth
and Enhances Central and Peripheral
Nerve Regeneration.
Front. Cell. Neurosci. 13:40.
doi: 10.3389/fncel.2019.00040

Axonal growth during normal development and axonal regeneration rely on the action of many receptor signaling systems and complexes, most of them located in specialized raft membrane microdomains with a precise lipid composition. Cholesterol is a component of membrane rafts and the integrity of these structures depends on the concentrations present of this compound. Here we explored the effect of cholesterol depletion in both developing neurons and regenerating axons. First, we show that cholesterol depletion *in vitro* in developing neurons from the central and peripheral nervous systems increases the size of growth cones, the density of filopodium-like structures and the number of neurite branching points. Next, we demonstrate that cholesterol depletion enhances axonal regeneration after axotomy *in vitro* both in a microfluidic system using dissociated hippocampal neurons and in a slice-coculture organotypic model of axotomy and regeneration. Finally, using axotomy experiments in the sciatic nerve, we also show that cholesterol depletion favors axonal regeneration *in vivo*. Importantly, the enhanced regeneration observed in peripheral axons also correlated with earlier electrophysiological responses, thereby indicating functional recovery following the regeneration. Taken together, our results suggest that cholesterol depletion *per se* is able to promote axonal growth in developing axons and to increase axonal regeneration *in vitro* and *in vivo* both in the central and peripheral nervous systems.

Keywords: regeneration, cholesterol, lipid rafts, axon growth, growth cone, filopodia

INTRODUCTION

Axonal guidance during the development of the nervous system is thought to be highly regulated through interactions of transmembrane receptors with attractive, repulsive, and trophic cues. Similar mechanisms regulate axonal regeneration after injury. The transected axon undergoes morphological changes to form the growth cone, a highly dynamic structure that senses the environment and leads the regenerative growth (Allodi et al., 2012). Membrane receptors localized in the growth cone have an important role in axonal signaling (Guirland et al., 2004; Kamiguchi, 2006). The regenerative shift of axotomized neurons is promoted by injury-induced signals, which stimulate the transcription of various trophic factors,

adhesion molecules, growth-associated proteins and structural components needed for axonal regrowth and cell survival (Rishal and Fainzilber, 2014).

Many intrinsic and extrinsic signals can promote or inhibit axonal regeneration. Due to the importance of these signals during axonal degeneration and regeneration after peripheral nerve injury, microdomains in the membrane that cluster a range of proteins and molecules related to cellular signaling may play a key role in the regulation of these pathways. In particular, lipid rafts have been described as cholesterol-enriched cell membrane microdomains that compartmentalize lipids and protein to form signaling platforms (Golub et al., 2004).

Cholesterol is a major component of the nervous system, being essential for normal brain development. The brain is the most cholesterol-rich organ, containing about 20% of the body's total cholesterol (Bjorkhem and Meaney, 2004). Under normal physiological situations and because plasma lipoproteins do not cross the intact blood-brain barrier, nearly all cholesterol in the brain is synthesized *in situ* (Dietschy and Turley, 2001). Brain cholesterol is an important structural component of cellular membranes and myelin. It is also required for the synthesis of steroid hormones and for the organization of lipid rafts, which are involved in many aspects of brain function, such as growth factor signaling, synapse and dendritic formation (Goritz et al., 2005), and axon elongation and guidance (de Chaves et al., 1997).

Here we studied the effects of altered membrane integrity by reducing the cholesterol content in the axons of three neuronal systems, namely hippocampal and cerebellar external granular layer (EGL) cells as a Central Nervous System (CNS) example, and the dorsal root ganglion (DRG) neurons as a Peripheral Nervous System (PNS) example. We show that depletion of cholesterol leads to increased sizes of growth cones, filopodial extensions and neurite length. Moreover, we also demonstrate that cholesterol membrane and raft disruption increase the regenerative capacity of axons after axotomy both *in vitro* and *in vivo* and enhance muscle and sensory re-innervation of distal targets. On the basis of our findings, we propose that acute reduction of neuronal cholesterol emerges as a potential therapeutic strategy to improve regenerative outcomes after peripheral nerve lesion.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Antibodies

The following antibodies were used: anti-GFP (A11122, Invitrogen); anti-III β -tubulin (MMS-435P, Covance); anti-growth associated protein 43 (GAP43) (AB5220, Millipore); anti-myelin basic protein antibody (MBP) (ab7349, Abcam); anti-neurofilament H (NF-H) (AB5539, Millipore); Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (A-21202, Thermo Fisher); Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (A-21206, Thermo Fisher); Goat anti-Chicken IgY (H+L) Alexa Fluor 488 (A-11039, Thermo Fisher), Biotinylated Horse anti-rabbit IgG (BA-1000, Vector); Biotinylated Goat anti-rat IgG (BA-9400, Vector), Streptavidin-Biotinylated HRP

Complex (RPN1051, GE Healthcare); and Streptavidin-Alexa Fluor 594 (S32356, Thermo Fisher).

The following drugs and reagents were used: poly-D-Lysine (P7280, Sigma); laminin (L2020, Sigma); Nystatin dihydrate (N4014, Sigma); Cholesterol Oxidase *Streptomyces* sp. (ChOx) (228250, Calbiochem); Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) (C4555, Sigma); DMSO (D5879, Sigma); phalloidin – TRITC (P1951, Sigma); biocytin (B4261, Sigma); Cholera Toxin Subunit B (Recombinant) Alexa Fluor 594 (CTxB-594) (C34777, Life BioSciences).

Primary Cultures

Hippocampus

Primary cultures of mouse hippocampi were prepared from E16–E17. Pregnant CD1 mice were sacrificed by cervical dislocation, and the fetuses were collected in a PBS-glucose 0.3% solution and then decapitated. Hippocampi were isolated and trypsinized for 6 min at 37°C. Trypsin was then neutralized with FBS and incubated with DNase for 10 min at 37°C. Neurons were then centrifuged at 800 rpm for 5 min, resuspended and plated in pre-coated culture glasses with poly-D-lysine in medium containing Neurobasal (w/o L-glutamine, w/Phenol Red; GIBCO, 21103-049), 1% penicillin/streptomycin (GIBCO, 15140-122), 1% glutamine (GIBCO, 25030-024) and 2% B27 (GIBCO, 17504-044).

Cerebellum

Primary cultures of cerebellums were prepared from P4–P5 CD1 mice sacrificed by decapitation. Cerebellums were isolated, mechanically disaggregated and trypsinized as previously described. After centrifugation, neurons were resuspended in 2 mL of DMEM, and EGL were isolated by centrifugation in a percol gradient. After a wash centrifugation, EGL were plated in pre-coated culture glasses with poly-D-lysine in medium containing DMEM (GIBCO, 41966-029), 1% penicillin/streptomycin (GIBCO, 15140-122), 1% glutamine (GIBCO, 25030-024), 4.5% D-(+)-Glucose (Sigma, G-8769), 5% NHS (GIBCO, 26050-088), and 10% FBS (GIBCO, 16000-044) for 24 h, and then NHS and FBS were replaced by 2% B27 (GIBCO, 17504-044) and 1% N2 (GIBCO, 17502-048).

Dorsal Root Ganglion (DRG)

Primary cultures of DRG neurons were prepared from E13–E14 mice. Pregnant CD1 mice were sacrificed by cervical dislocation, and the fetuses were collected and decapitated. DRG neurons were isolated and trypsinized as previously described. After centrifugation, neurons were resuspended and plated in pre-coated culture glasses with poly-D-lysine and laminin in medium containing DMEM (GIBCO, 41966-029), 1% penicillin/streptomycin (GIBCO, 15140-122), 1% glutamine (GIBCO, 25030-024), 0.06% D-(+)-Glucose (Sigma, G-8769), 0.0045% NaHCO₃ (GIBCO, 25080-060), 2% B27 (GIBCO, 17504-044) and 5 μ g/ml NGF.

Organotypic entorhino-hippocampal slice cultures were obtained from P0 actin-GFP and WT mice sacrificed by decapitation. Horizontal sections 325 μ m thick containing both the entorhinal cortex (EC) and the hippocampus were

obtained by cutting tissue pieces in a chopper (McIlwain Tissue Chopper, Standard Table, 220V, Prod 10180-220). Slices were laid on a porous Millicell CM plate culture insert (Millipore, PICM03050) and incubated using the interface culture technique. The medium comprised 35.5% Neurobasal, 25% MEM powder, 25% NHS (GIBCO, 26050-088), 12.5% HBSS (w/Mg, w/Phenol Red, GIBCO, 24020-083), 0.5% D-(+)-glucose (Sigma, G-8769), 1% glutamine (GIBCO, 25030-024), 1% penicillin/streptomycin (GIBCO, 15140-122), 1.1% sodium pyruvate (Sigma, P2256-5G), 0.04% NaHCO₃ (GIBCO, 25080-060), 2% B27 (GIBCO, 17504-044) and 1% N2 (GIBCO, 17502-048). The medium was changed every 2 days. After 21 days *in vitro* (DIV), axotomy was performed between the EC and the hippocampus with a needle, and WT hippocampi were put with EC GFP. The cultures were treated for 10 days with Nystatin or control medium and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 1h. Cultures were cut into 60 μ m slices with a vibratome (Leica VT 1000 S) and cryopreserved at -20°C until immunohistochemistry was performed.

Drug Treatments *in vitro*

Growth Cone and Filopodium Experiments

Hippocampal and EGL primary cultures were treated after 3 DIV and DRG after 1 DIV with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nystatin for 10 min, 0.5 mM M β CD for 10 min or 2U ChOx for 2 h. They were then incubated for an additional 30 min in culture media (Neurobasal or DMEM) and then fixed in 4% PFA.

Axon Extension and Branching Experiments in DRG Neurons

After 2 h in culture, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nystatin and 2U ChOx were added to the media for 24 h and neurons were then fixed. After 22 h *in vitro*, and therefore 2 h before neurons were fixed, 0.5 mM M β CD was added to the media.

Axotomy Experiments

Axotomy in microfluidic chambers (AX50010TC, Millipore) was performed with a pipette connected to a vacuum pump. Complete axotomy was verified in the inverted microscope. Immediately after axotomy, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nystatin was added and maintained in the culture for 3 days. In organotypic cultures, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nystatin was added to the media just after axotomy and maintained for 10 days, changing the media every 2 days.

Animals and Surgical Procedures

To study the effect of cholesterol depletion on healthy mice, 10 OF1 female mice (20–25 g) were divided in two groups and treated with saline (vehicle) or M β CD 1000 mg/kg/week intraperitoneal (i.p.) during 1 month. To study the effect of lipid raft disruption on peripheral nerve regeneration, 13 female mice (25–30 g) were injured on the sciatic nerve and allowed to regenerate for 1 month while receiving saline ($n = 6$) or 1000 mg/kg/week M β CD ($n = 7$) i.p. treatment.

To perform the nerve injury, animals were anesthetized by i.p. injection of ketamine (90 mg/kg; Imalgene 500, Rhône-Merieux, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg; Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany). The right sciatic nerve was surgically

exposed at the mid thigh and carefully freed from adherences to surrounding tissues. Afterwards, it was cut at 45 mm from the tip of the 3rd toe and immediately repaired using two epineurial sutures (10–0), maintaining the fascicular alignment of the sciatic branches. Finally, the wound was sutured in planes and disinfected. Animals were left to recover on a hot pad after being returned to their cages. The left paw was left uninjured as a control.

All the animals had food and water *ad libitum* and were kept at a standard temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and under 12:12-h light-dark cycles (300 lux/0 lux). The experimental procedures followed the recommendations of the European Communities Council Directive 2010/63/EU for the care and use of laboratory animals and were approved by the Committee for Ethics on Experimental Animal and Human Research of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Electrophysiology Tests

To test possible effects of M β CD on intact animals, electrophysiological tests were performed every 7 days after beginning of the treatment and for 4 weeks. To monitor peripheral nerve regeneration, electrophysiological tests were performed at 14, 21, 25, 28, and 33 days post-injury (dpi).

Animals were anesthetized with pentobarbital (10 mg/kg) and the sciatic nerve was stimulated using two needle electrodes inserted percutaneously at the sciatic notch, applying single rectangular pulses of 0.02 ms up to the voltage required to obtain a maximal evoked response. The compound muscle action potentials (CMAP, M wave) evoked by stimulation of motor nerve fibers were recorded from the tibialis anterior (TA) and plantar (PL) muscles with microneedle electrodes. All potentials were amplified and displayed on a digital oscilloscope (Tektronix 450S; Tektronix, Beaverton, OR, United States) at the appropriate settings for latency and amplitude measurements from the baseline to the maximal negative peak. During the tests, the animals were placed over a warmed flat coil controlled by a hot water circulating pump to maintain body skin temperature.

Locomotion Evaluation

The DigiGait system (Mouse Specifics, Boston, MA, United States) was used to assess locomotor performance of healthy animals treated with M β CD or vehicle at weekly intervals during treatment. The mice were forced to run over the transparent belt of a motorized treadmill and recorded with a high-speed video camera (80 frames/s) from below while running at a constant treadmill velocity of 20 cm/s. A minimum of 200 images were collected for each walking mouse containing more than eight strides for each run and each video was analyzed with the DigiGait software. The print length, and the toe spread distance between toes 1–5 and toes 2–4 were measured, and the sciatic functional index (SFI) between the right and the left paw was calculated (Navarro, 2016).

Mechanical Algesimetry

The algesimetry tests for mechanical stimuli were performed on both hindpaws every week along treatment in uninjured animals. Sensibility to a non-noxious mechanical stimulus was

measured by using an electronic Von Frey algesimeter (Bioseb, Chaville, France). Mice were placed on a wire net platform in plastic chambers 10 min before the experiment for habituation. The hindpaw plantar surface was stimulated from the bottom of the box by applying a 0.4 mm non-noxious pointed metal probe to the central area of the paw, and then slowly increasing the pressure until the mouse raised the paw, with a 35 g cut off force to avoid skin damage. The mechanical nociceptive threshold was taken as the mean of three measurements per paw and the threshold was expressed as the force (in grams) at which mice withdrew the paw in response to the stimulus (Cobianchi et al., 2014).

Pinprick Test

Progression of nociceptive reinnervation of the hindpaw was assessed at 14, 21, 25, 28, and 33 dpi by means of the pinprick test. Awake animals were gently wrapped in a cloth with the injured paw facing upward. The skin surface near C plantar pad and 4th toe (more distal) were stimulated with a blunt needle with enough intensity to indent the skin without damaging it (Cobianchi et al., 2014). Each site was stimulated twice and responses were recorded as positive only when clear pain reactions such as fast withdrawal or vocalization were triggered. Positive responses were taken as a sign of functional reinnervation of the skin.

Histology, Immunohistochemistry and Immunocytochemistry

Neurons were fixed with a solution of 4% PFA in PBS for 10 min. Subsequently, they were rinsed with PBS and permeabilized with a solution of triton 0.1% X-100 in PBS for 10 min. Afterwards, they were rinsed with PBS once more, and blocking solution (NHS 10% in PBS) was added for 1 h at room temperature. After blocking, the cells were incubated for 2 h with the respective primary antibodies diluted in blocking solution. Unbound primary antibodies were washed with PBS, and neurons were incubated with the respective secondary antibodies in blocking solution for 1 h at room temperature. For F-actin staining after permeabilization, phalloidin diluted in PBS was added and maintained for 30 min. Neurons were mounted using Mowiol.

Organotypic slices were rinsed with PBS with 0.5% Triton three times, and were incubated for 2 h at room temperature with blocking solution (10% NHS, 0.2M Glycine in PBS-Gelatin with 0.5% Triton). After blocking, the cells were incubated overnight at 4°C with the respective primary antibodies diluted in antibody solution (5% NHS in PBS-Gelatin with 0.5% Triton). Unbound primary antibodies were washed with PBS with 0.5% Triton, and slices were incubated with the respective secondary antibodies in antibody solution for 2 h at room temperature.

For the *in vivo* regeneration experiment, mice were transcardially perfused with 4% PFA in PBS (0.1 M, pH 7.4) 1 month after beginning the treatment. Subsequently, the sciatic nerve, spinal cord, L4 and L5 DRG neurons were removed, postfixed for 24 h with PFA and cryopreserved in PB containing 30% of sucrose for immunohistochemistry analysis. Samples were serially cut (15 μm) with a cryotome (Leica CM190) and stored at -20°C for further analysis.

For cholesterol depletion analysis, samples were defrosted for 30 min at room temperature and then rehydrated with PBS for 5 min. DRG neurons were then incubated for 3 h at room temperature with CTxB (1:200) in PBS. Slides were washed and mounted using Mowiol.

For immunohistochemistry, samples were defrosted at room temperature, blocked with PBS-specific animal serum, and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies rabbit anti-GAP43 (1:100), rat anti-MBP (1:200) and chicken anti-NF-H (1:100). After washes, sections were incubated with the respective biotinylated secondary antibody (1:200) for GAP43 and MBP and then for 1 h at room temperature with conjugated Alexa Fluor streptavidin (1:200) or Alexa Fluor anti-chicken IgY. Finally, sections were mounted with Mowiol containing DAPI for nuclear staining.

Image Analysis

Images of primary cell cultures were taken in an epifluorescence microscope (Eclipse Nikon E1000) with a 60× oil-immersion objective. To take images from the *in vitro* axotomy experiments, we used an inverted microscope (Olympus ScanR) with a 20× objective. For images of the organotypic cultures, we used a confocal microscope (Leica TCS SP5) with a 20× objective and a 20× objective with 2× zoom to quantify axon regeneration. Images of the tibial nerve with MBP and NF-H immunostaining were taken 10 mm distally from the injury site with an epifluorescence microscope (Eclipse Ni, Nikon) attached to a digital camera (DS-Ri2, Nikon). Finally, we used a confocal fluorescent microscope (Zeiss LSM 700) to acquire the images from the SC and DRG tissue sections stained with GAP43, and images were analyzed with ImageJ (Schneider et al., 2012). Briefly, the area of the soma of at least 100 DRG neurons/animal and 10 motoneurons/animal were taken as ROI, and the integrated density (mean gray value × area) was obtained. The mean value obtained for each animal was used for comparison (Romeo-Guitart et al., 2018).

Statistical Analysis

All *in vitro* experiments were done three times independently. Data show means ± SEM. To analyze the statistics, we used GraphPad software and applied ANOVA test for multiple conditions or the Student's *t*-test for two conditions. *In vivo* results are presented as mean ± SEM and means were compared with two-tailed, unpaired Student's *t*-test, two-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test or Mantel-Cox test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Cholesterol Depletion Increases Growth Cone Area and Number of Filopodia in Hippocampal and EGL Cerebellar Axons

Growth cones play a key role during axonal growth and guidance. First, we examined the effect of cholesterol depletion on the morphological features of growth cones. To this end,

we treated hippocampal and EGL neurons with two drugs that efficiently reduce cholesterol in the cell membrane (Nystatin and M β CD), and with ChOx, a cholesterol-depleting enzyme (Figure 1) (Bolard, 1986; Cahuzac et al., 2006; Zidovetzki and Levitan, 2007). Both neuron types were kept in culture for 3 DIV before being treated with the aforementioned drugs. In hippocampal neurons, depletion of cholesterol driven by the three drugs significantly increased the growth cone area identified by phalloidin staining (Figures 1A,C). However, only Nystatin increased this parameter in EGL neurons (Figures 1B,D). Overall, our results show that cholesterol depletion increases the growth cone area in hippocampal and EGL neurons in the CNS.

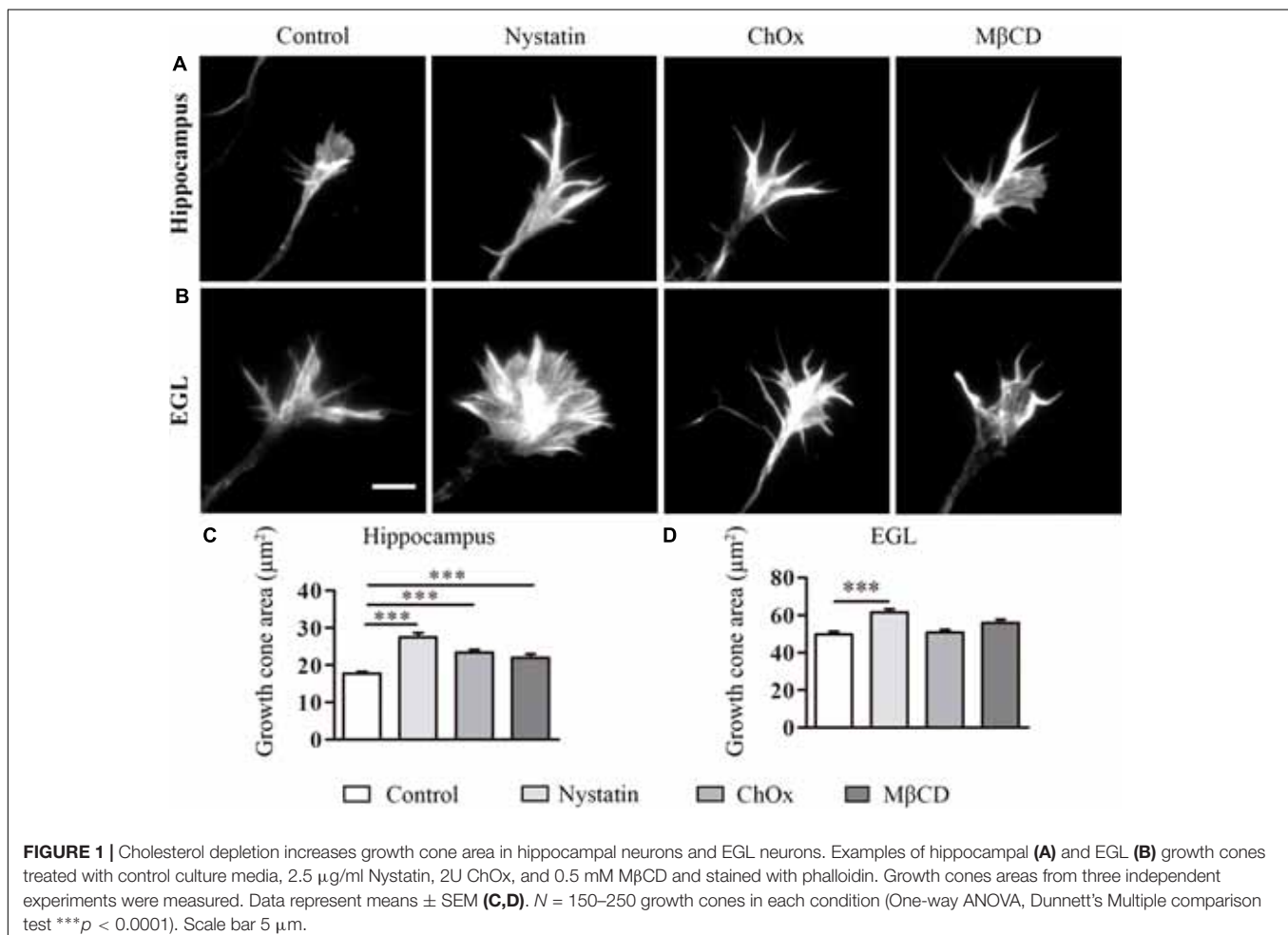
During the course of the experiments, we observed another effect of cholesterol depletion, namely the development of numerous filopodium-like extensions/branching points along neurites. Filopodia, dynamic membranous structures driven from the actin cytoskeleton, are necessary for axonal motility, guidance, branching and regeneration. To determine the importance of cholesterol in the formation of filopodium-like structures, we again treated hippocampal and EGL neurons with Nystatin, ChOx, and M β CD (Figure 2). The filopodium-like structures were counted in discrete segments of hippocampal and EGL axons (Figures 2A,B). Cholesterol

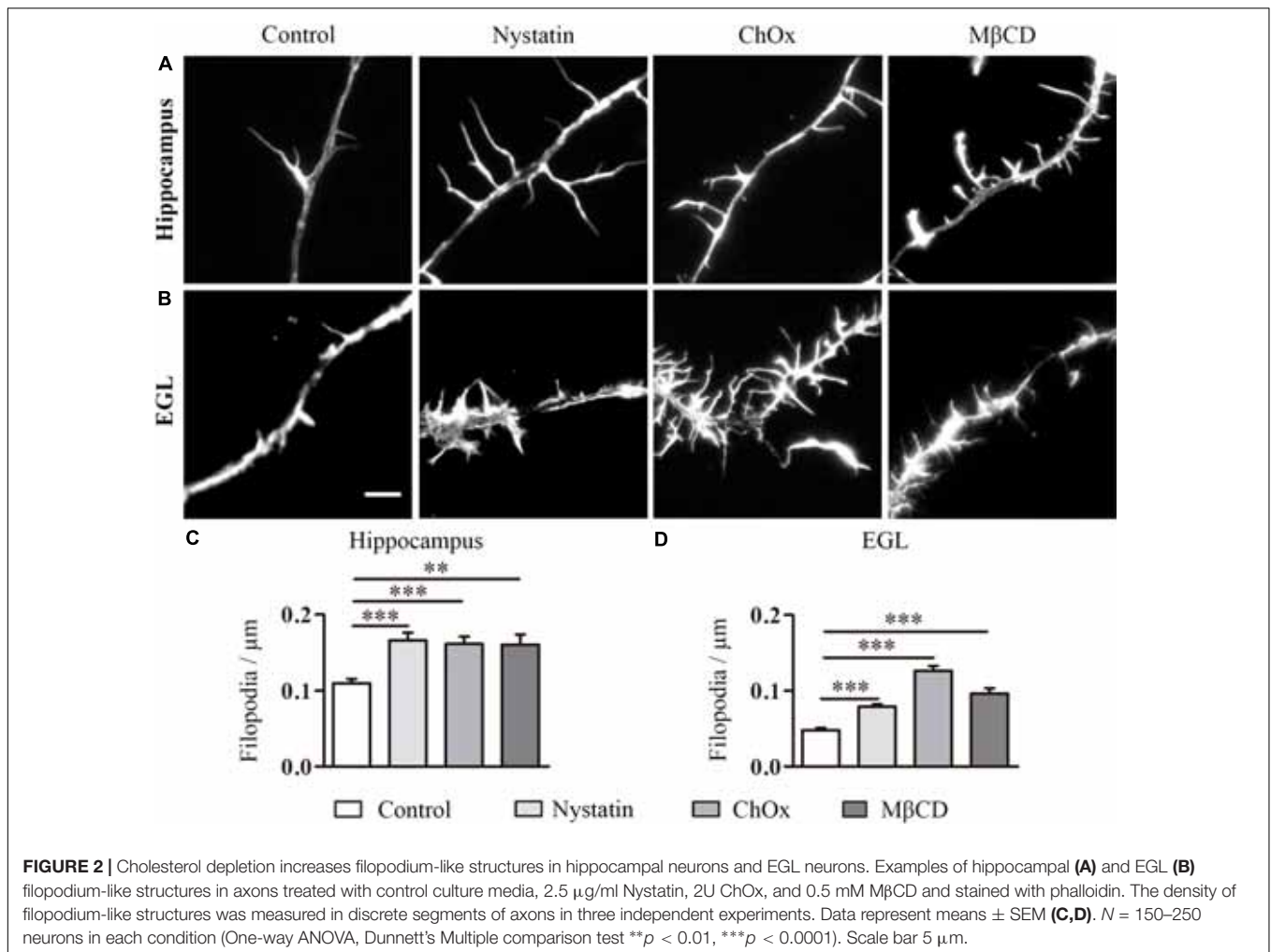
depletion induced by these drugs led to a significant increase in the number of filopodium-like structures in both types of neuron (Figures 2C,D).

These results indicate that a reduction in the cholesterol content of the cell membrane of both types of neuron promoted an increase in the number of filopodium-like structures and branching. In contrast to the effect of these drugs on growth cone area, these compounds enhanced the number of filopodia/branches in hippocampal and EGL neurons.

Cholesterol Depletion Affects Growth Cone Area, Number of Filopodia, and Neurite Extension in DRG Neurons

To determine whether the effects of cholesterol depletion observed in the CNS neurons can be extrapolated to the PNS, we performed the same experiments using DRG neurons (Figure 3). DRG neurons were isolated from mouse embryos at E13–14 and treated after 1 DIV with cholesterol removal agents. Treatment with Nystatin and ChOx led to an increase in growth cone area in DRG neurons (Figures 3A,C), and the removal of cholesterol with any of the three drugs enhanced the number of filopodia (Figures 3B,D).





We also quantified the effect of cholesterol depletion on neurite extension and branching (Figure 4). Treatments were performed for 24 h in the case of Nystatin and ChOx and for 2 h before fixation in the case of M β CD, as we observed increased cell death with longer incubations with this drug. Only the treatment with Nystatin increased the total length of DRG neurites while ChOx and M β CD did not affect this parameter (Figures 4A,B). We found that 24 h treatments with Nystatin and ChOx led to a significant increase in the number of branching points (Figures 4A,C).

These results suggest that pharmacological removal of cholesterol from the cell membrane has similar effects on CNS (hippocampal and cerebellar) and PNS (DRG) neurons. An acute decrease in cholesterol levels *per se* increases growth cone area and filopodia/branching point density in developing neurons.

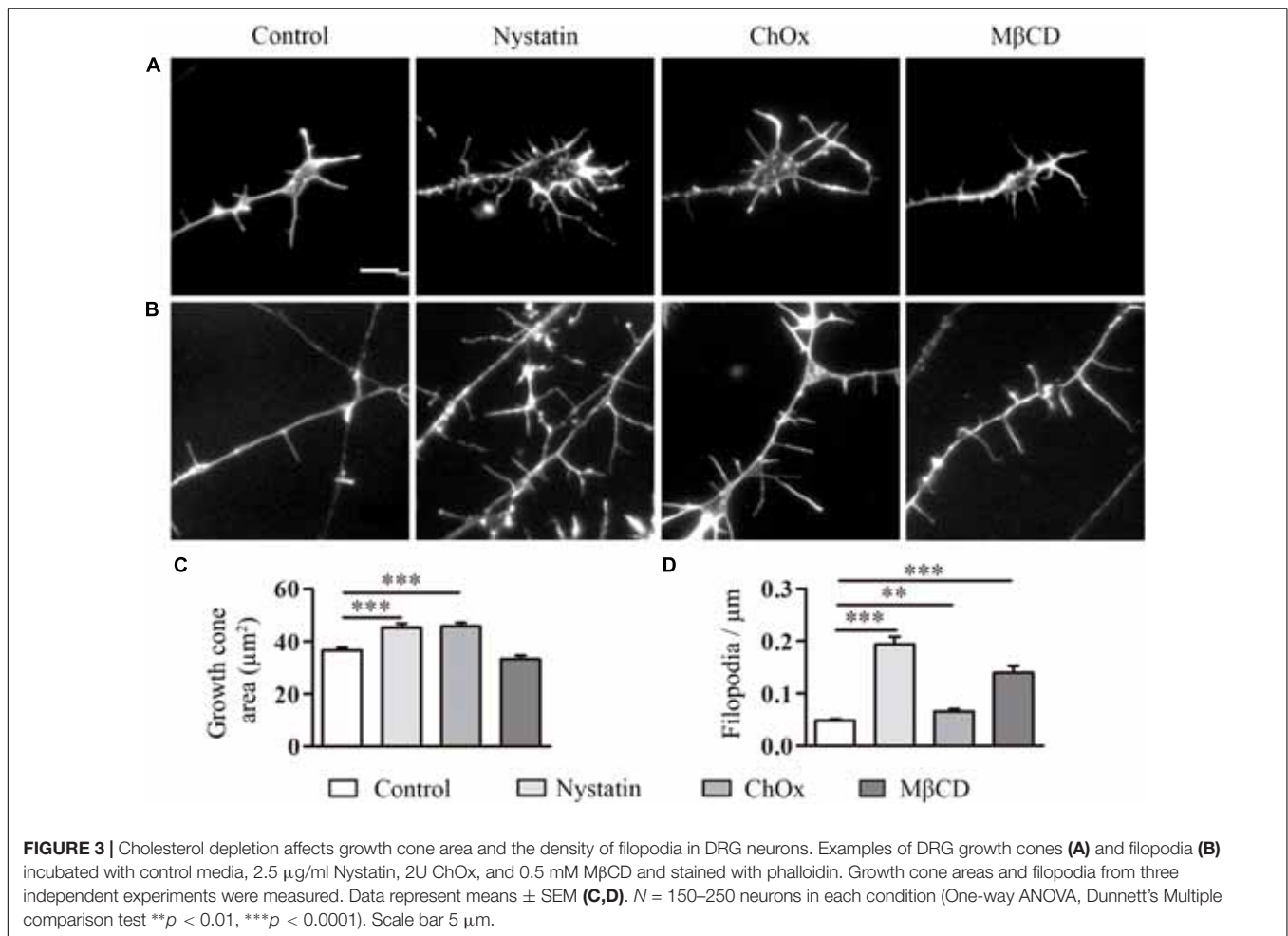
Cholesterol Depletion Improves Axonal Regeneration After Axotomy *in vitro* and *ex vivo*

One of the hallmarks of CNS regeneration is the difficulty to achieve the regrowth of damaged axons. This difficulty is

attributed mainly to the generation of an axon blocking “milieu.” As we have shown that cholesterol depletion increases axonal growth cone area and axonal extension, we next addressed, using an *in vitro* and an *ex vivo* system, whether depletion of this lipid enhances axonal regeneration.

First, E16 hippocampal neurons were seeded in a microfluidic chamber (Figure 5) and neurons were axotomized. This chamber allowed us to differentially treat the axons, on one side with control medium and on the other with medium supplemented with Nystatin applied immediately after axotomy (Figure 5D). Axons treated with Nystatin showed a significant increase in length when compared with those cultured in basal control medium (Figures 5A–C).

These results suggest that the removal of cholesterol by means of Nystatin enhances axon regeneration after axotomy *in vitro*. We next used the *ex vivo* organotypic model of axotomy and regeneration (del Rio and Soriano, 2010). Slice co-cultures from P0 mouse hippocampi and the EC were isolated and kept in culture for 21 days (Figure 6). Some EC slices were obtained from actin-GFP transgenic mice. At 21 DIV, axotomy was performed sectioning the entorhino-hippocampal connection (EHP) using a needle, and mixed



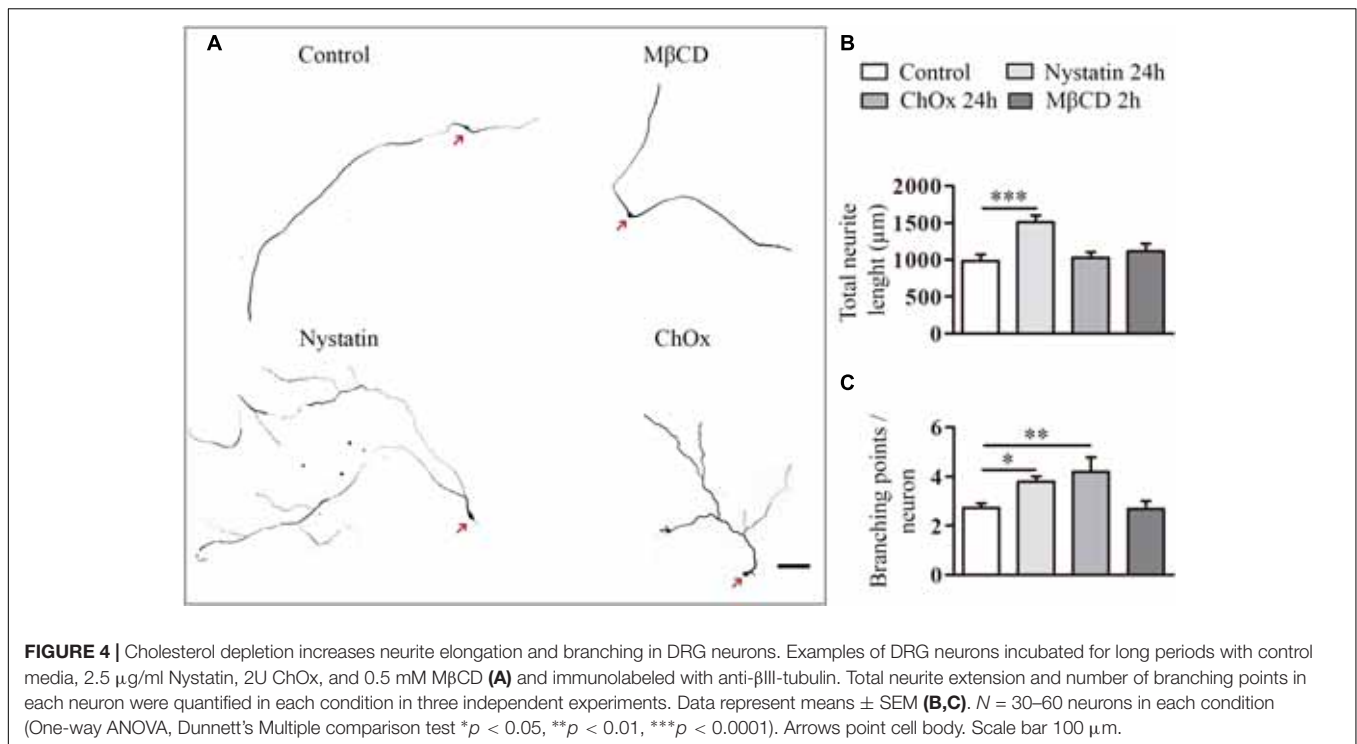
co-cultures were generated. The hippocampi from actin-GFP co-cultures were removed and replaced by hippocampi from WT mice organotypic cultures, thereby allowing the direct visualization of regenerating GFP-positive EC-hippocampal axons. Axotomized organotypic cocultures were treated with Nystatin for 10 additional days (Figure 6A). In axotomized co-cultures that were not treated with Nystatin, virtually no regenerating axons (or very few) were found in the SLM/ML layers, which are the layers of termination of the EHP pathway (Figures 6B,D). In contrast, after Nystatin treatment, we observed a 10-fold increase in the density of regenerating EC axons present in the SLM/ML layers (Figures 6C,D). Organotypic cultures treated with Nystatin showed a normal morphology and distribution, and no evidence of neuronal degeneration was appreciated (Figure 6C). In another set of experiments, WT EC slice-cocultures were generated and axotomized as described above (Figure 6A) and regenerating EC axons were visualized by Biocytin injections (del Rio and Soriano, 2010). Again, the number of regenerating EHP axons was markedly increased by the incubation with Nystatin. Together with the above results, the present findings indicate that cholesterol depletion favors axonal regeneration *in vitro* and *ex vivo*.

Treatment With M β CD Has No Effect on Healthy Mice

The results of motor electrophysiological tests performed showed that M β CD administration *in vivo* did not cause any impairment in the mice. The M wave amplitude (Supplementary Figures S1A,B) and latency (Supplementary Figures S1C,D) of TA and PL muscles did not present significant differences between M β CD treated and saline control groups. The walking track test yielded no differences in the SFI between groups (Supplementary Figure S1E). Finally, mechanical algometry was performed to evaluate possible changes in nociception in M β CD treated animals. Results showed no significant differences between control and treated animals in pain threshold along time (Supplementary Figure S1F).

Treatment With M β CD Alters the Integrity of the Lipid Raft by Reducing the Amount of Membrane Cholesterol

Our previous results suggest that cholesterol depletion is directly involved in promoting axonal regeneration. However, we next sought to determine the effect of acute reduction of cholesterol levels in the *in vivo* model of peripheral nerve lesion and



regeneration. Cholesterol is a major component of lipid rafts, which are specialized membrane microdomains that hold a multitude of signaling receptors. It has recently been shown that disruption of the raft by acute depletion of cholesterol promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury (Tassew et al., 2014). Thus, we first examined the integrity of raft structures in DRG nerves after acute depletion of cholesterol by treatment with M β CD. Contralateral DRG neurons of injured mice treated with M β CD or saline were incubated with the CTxB. This fraction of the toxin has a known affinity for ganglioside GM1, a lipid raft-associated molecule (Schnaar et al., 2014) widely used as a marker of the presence of cholesterol in the cellular membrane and of lipid raft integrity. Fluorescent staining showed clear CTxB labeling in the plasma membrane of DRG neurons from animals that received vehicle for 1 month (Figure 7A) in comparison with those treated with M β CD (Figure 7B).

Cholesterol Depletion Induced by M β CD Increases GAP43 in Sensory Neurons After Axotomy

To study the regenerative response in sensory (Figure 8A) and motor (Figure 8B) neurons after nerve section, the expression of the GAP43 was measured. GAP43 is expressed at high levels during development and axonal regeneration, and it is considered a crucial component of an effective regenerative response in the nervous system, being used as a marker of regeneration in injured axons. The results showed higher immunoreactivity for GAP43 in DRG neurons in injured animals treated with M β CD compared to those treated with vehicle (Figure 8C). This observation indicates that cholesterol depletion after sciatic injury enhances

the neuronal regenerative program. No significant difference was observed for motoneurons (Figure 8D). Moreover, myelin staining of the regenerated nerve was conducted to assess whether lipid raft disruption could affect axonal remyelination. Qualitative assessment of both saline- and M β CD-treated animals (Figure 8E) shows similar presence of myelin in nerve fibers of both groups, thus indicating that lipid raft disruption did not block remyelination after injury.

Cholesterol Depletion Induced by M β CD Improves Muscle Reinnervation and Sensory Responses in Mice

Electrophysiological tests performed to follow up nerve regeneration after sciatic nerve section and repair showed a progressive increase in the amplitude of the M wave of the two muscles in both groups, thereby indicating progressive reinnervation of the muscles by the regenerated axons. Although no differences were seen for the proximal TA muscle, M β CD-treated mice had significantly higher M wave amplitude of the PL muscle than control animals at 33 days (Figures 9A,B), indicative of greater reinnervation of the distal muscles. Values of M wave latency did not show significant differences between the two groups (Figures 9C,D).

No signs of autotomy, that could be indicative of neuropathic pain, were found in any studied mice. Recovery of sensitivity was studied by means of the pinprick test on areas of the paw from proximal to distal region of the sciatic nerve innervation territory (Cobianchi et al., 2014). In the C plantar pad, no animals showed positive response at 21 days, and with time more animals recovered sensory response without differences

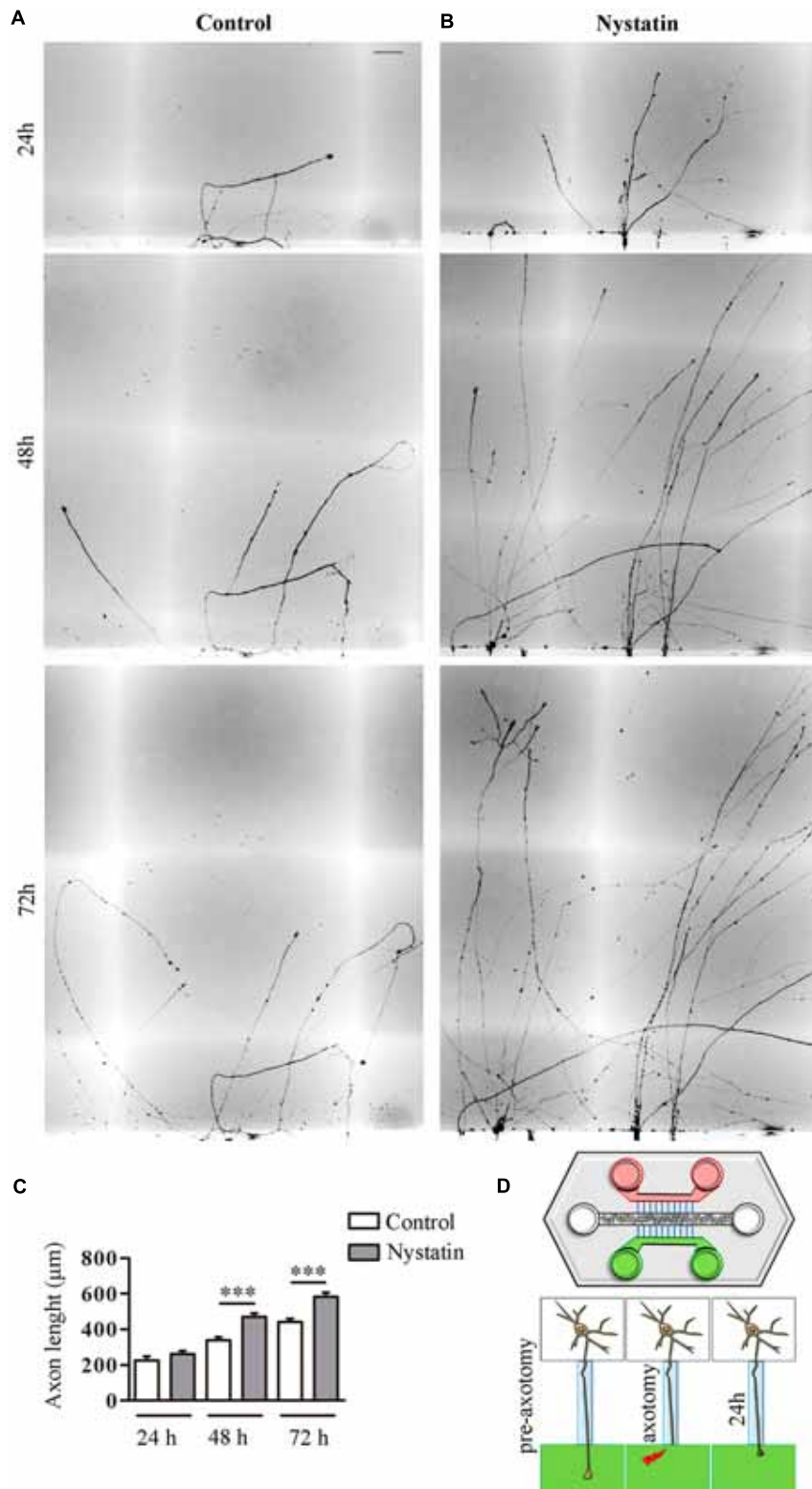
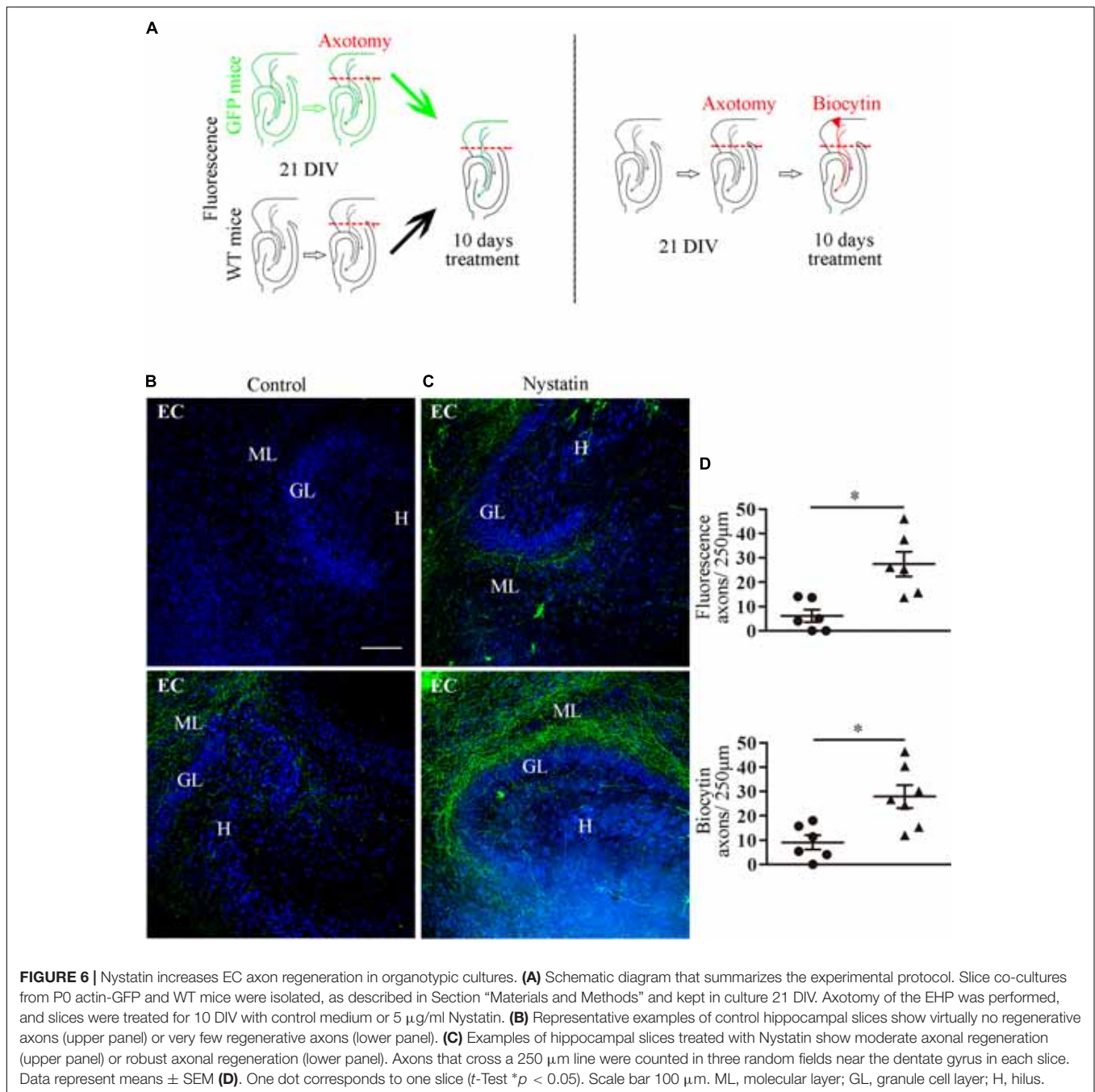


FIGURE 5 | Nystatin improves axon regeneration after axotomy *in vitro*. Examples of hippocampal axon regrowth at 24, 48, and 72 h after axotomy in control condition **(A)** and in response to treatment with 2.5 $\mu\text{g/ml}$ Nystatin **(B)**. Axon lengths were measured in each condition. Data represent means \pm SEM **(C)**.

Schematic diagram of a microfluidic chamber **(D)**. Cell bodies are in the central channel (white), axon growth through microfluidic channels (blue) to both sides (green and red). After axotomy, control medium was applied on one side (red) and Nystatin on the other (green). $N = 3$ chambers (t -Test in each time point, $***p < 0.0001$). Scale bar 50 μm .

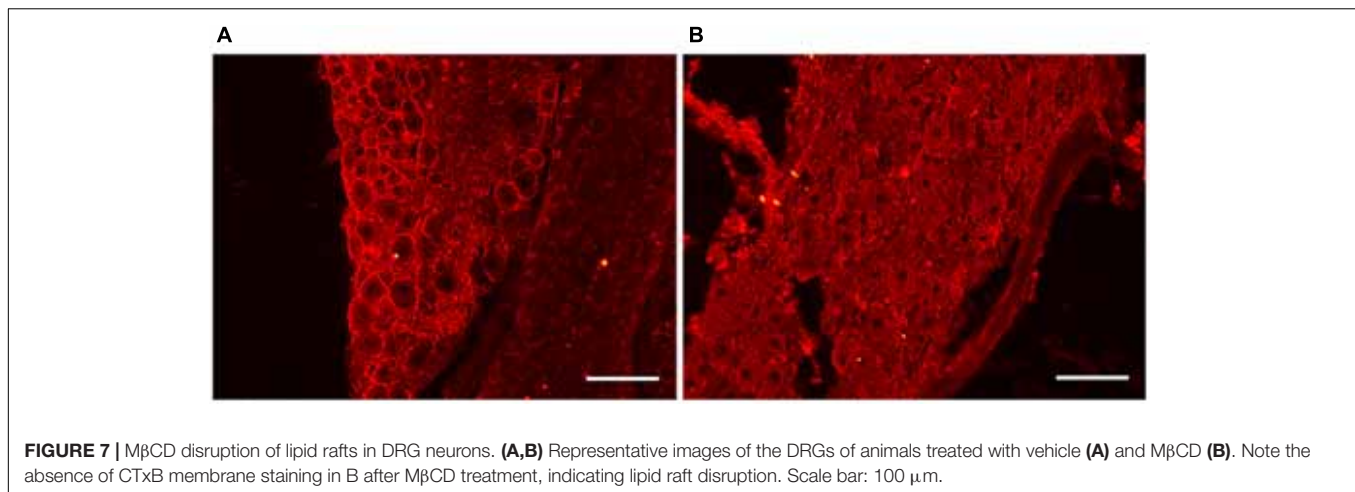


between groups. However, in the 4th toe, which is the most distal area, cholesterol-depleted mice showed positive response earlier than injured controls, and at 33 dpi, 50% of the M β CD group showed positive responses whilst only 12.5% of the vehicle-treated animals did (**Figures 9E,F**).

DISCUSSION

Following axotomy, several metabolic changes occur in injured neurons to reinnervate denervated targets and thus

ensure survival and regeneration. Moreover, a growth cone is formed at the tip of growing axons, and this process requires morphological and biochemical changes in the plasma membrane, including membrane extension and remodeling. In this context, cholesterol-rich lipid rafts, also called membrane microdomains, play a key role as signaling platforms of both growth-promoting and growth-inhibiting molecules. With regard to the possible contribution of lipid rafts and cholesterol to nerve regeneration, conflicting views can be found in the literature. Some authors demonstrated that lipid rafts promote axonal regeneration (Santuccione et al., 2005; Zhang et al., 2013)



while others claim that they have an inhibitory role (Vinson et al., 2003; Hausott et al., 2011). These contradictions can be explained by the fact that, in addition to a variety of proteins and molecules that promote axonal regeneration, such as receptors of neurotrophic factors, lipid rafts also contain proteins and molecules that exert an inhibitory role, such as receptors of myelin-associated proteins (Kappagantula et al., 2014). On the other hand, there is also some discrepancy about the role of lipid rafts in cell apoptosis. It is described that pro-apoptotic receptors like Neogenin, FAS and its ligand, JNK, PKC, Src kinases and a wide variety of lymphocyte-related receptors are more functional when are localized in lipid rafts, inducing a line of investigation in which lipid rafts are targets for chemotherapy (George and Wu, 2012). However, receptors related with cell survival, like Akt cascade, also depend on lipid rafts (George and Wu, 2012). It has been shown that cholesterol depletion with MβCD protects cerebellar neurons from apoptosis (Zhou et al., 2012) and after spinal cord injury, lipid raft disruption promotes cell survival due to a loss of function of Neogenin (Tassew et al., 2014). In conclusion, some of these studies were performed *in vitro* and sought to address the cellular pathway or the signaling of a specific neurotrophin through lipid rafts, and did not take into account all the trophic factors and cell responses that occur *in vivo*, but instead focused on single pathways.

In the present study, we show that cholesterol depletion in juvenile cultured neurons increases the size of growth cones and enhances neurite and axonal extension and the marked formation of filopodium-like extensions in both central and peripheral neurons. Although we did not address the underlying molecular mechanisms, we believe that both the membrane fluidity induced by cholesterol depletion and partial lipid raft disruption may account for the effects observed, as extracellular matrix and adhesion receptors are also grouped in lipid rafts (Leitinger and Hogg, 2002; Decker and French-Constant, 2004; Head et al., 2014). In addition, the increased size of neurites suggests that cholesterol depletion might be involved in the positive regulation of the exocytotic machinery needed for neurite growth (Ros et al., 2015).

Next, we addressed whether cholesterol depletion increases the regrowth of axotomized neurons in two *in vitro* models: dissociated hippocampal cultures and axotomized EC-hippocampal slice cultures. In both cases, we found a marked increase in the regenerative potential of lesioned axons, again suggesting that cholesterol depletion not only increases axonal length in developing axons but also axonal regrowth and regeneration *in vitro*. In addition, the observation that regenerated EC-hippocampal axons were correctly targeted to the appropriate termination layers (SLM and ML) indicates that cholesterol depletion does not alter the molecular mechanisms involved in the guidance and targeting of these axons to the hippocampus.

Membrane extension during axon growth after axotomy requires the incorporation of new lipids to the tips of the regenerating axons. Incorporated cholesterol in the axons of peripheral neurons after axotomy comes from transported cholesterol synthesized in the cell bodies of lesioned neurons (de Chaves et al., 1997), and from recycled cholesterol from cellular and myelin debris originated during the injury (Goodrum, 1991; de Chaves et al., 1997). The existence of multiple complementary mechanism to incorporate cholesterol into the re-growing membranes suggest a redundancy in the process of cholesterol reutilization. Our results *in vitro* and *in vivo* suggest that acute and medium-term reduction of cholesterol levels have positive effects for axon elongation and regeneration after nerve injury. However, further studies are required to evaluate long-term effects of systemic cholesterol reduction. Secondary undesired effects associated with alteration of membrane cholesterol levels should also have to be considered. Previous reports have found that MβCD may alter crayfish neuromuscular junction functioning in cold conditions (14°C) but not at 21°C (Ormerod et al., 2012) and cholesterol depletion in *Caenorhabditis elegans* results in decreased motility (Merris et al., 2004). Moreover, reduction of membrane cholesterol alters ion channel activity in sensory peripheral neurons (Saghy et al., 2015), with direct consequences for their hypersensitivity (Pristera et al., 2012) and the development of neuropathic pain (Ferrari and Levine, 2015; Amsalem et al., 2018). As a

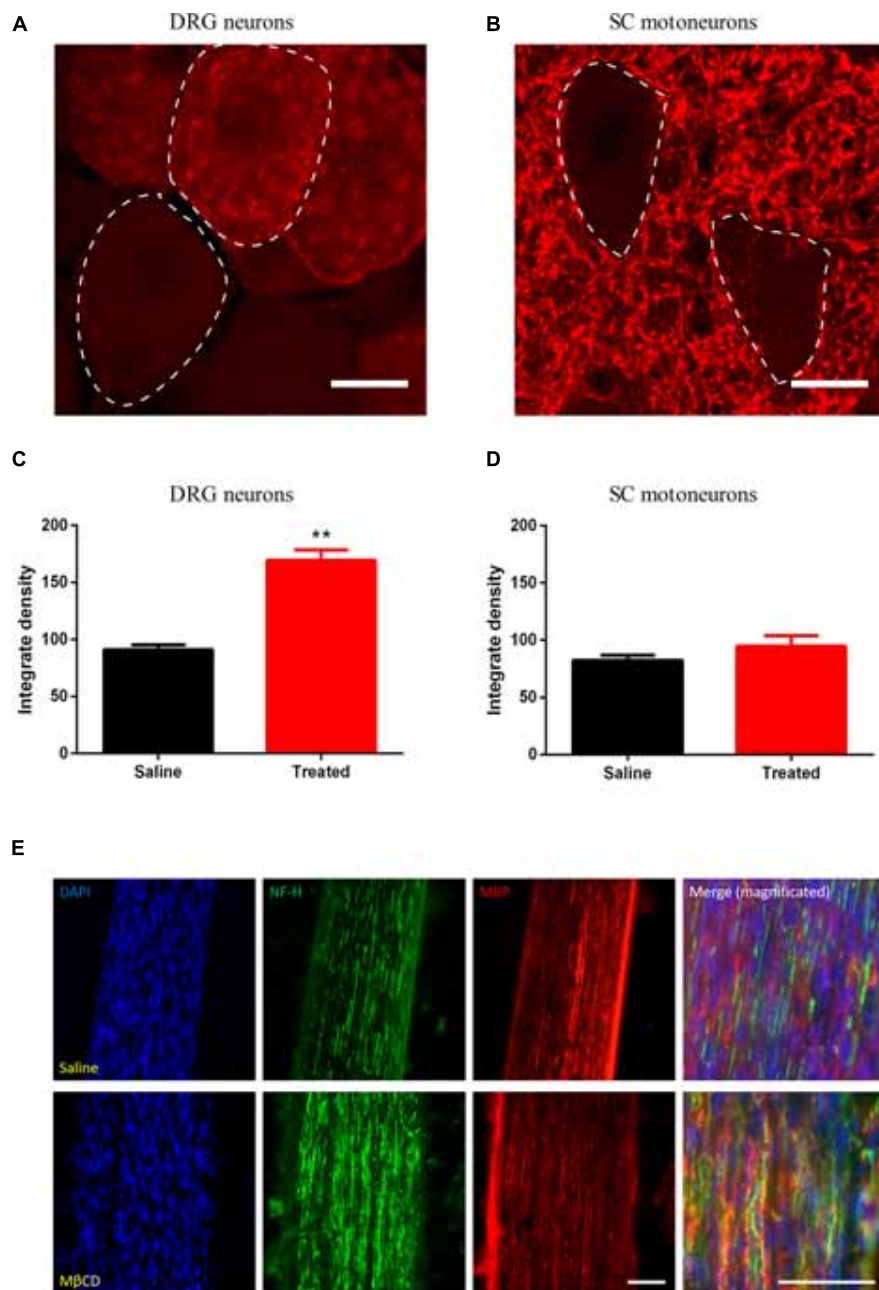


FIGURE 8 | MβCD increases GAP43 expression in injured DRG neurons. **(A,B)** Detail of DRG **(A)**, dashed line) and motoneurons **(B)**, dashed line) analyzed for GAP43 expression. **(C,D)** Quantification of GAP43 positivity in DRG neurons **(C)** and motoneurons **(D)** from animals treated with vehicle or MβCD vs. Saline. **(E)** Detail of a regenerated nerve stained for cell nuclei (blue), NF-H (green), and GAP43 (red) of saline- (top) and MβCD-treated (bottom) animals. Scale bar: 15 μm in **(A,B)**; 50 μm in **(E)**. Student's *t*-test, ***p* < 0.01.

consequence, electrophysiological tests, pain threshold tests and locomotion studies were performed on healthy animals to evaluate any possible effect derived from the systemic MβCD administration and the consequent membrane cholesterol depletion. Our results on healthy mice showed no significant differences between treated and control animals with reported values similar to those found in previous studies in the literature (Verdu et al., 1996; Bruna et al., 2010; Ale et al.,

2016). Of particular interest, the algometry results showed no indication of hyperalgesia in intact mice, and the absence of autotomy in mice in the regeneration experiment also points out that there was no increased pain sensitivity after lipid raft disruption (Casals-Diaz et al., 2009). Therefore, although some uncontrolled effect cannot be dismissed, 1 month of systemic MβCD administration and lipid raft disruption did not alter normal nervous system function in mice.

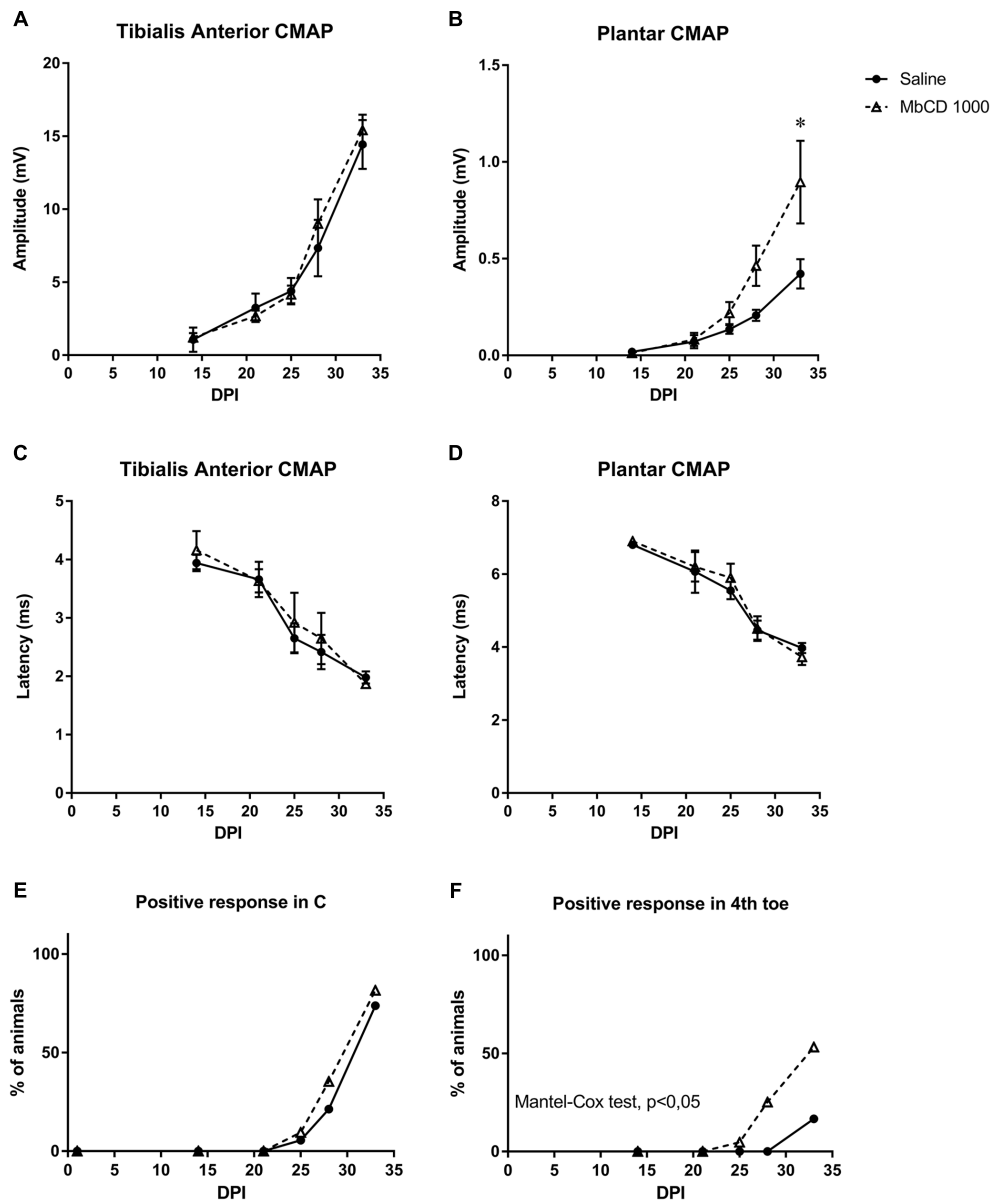


FIGURE 9 | M β CD treatment accelerates motor and sensory functional recovery following sciatic nerve injury. **(A–D)** Electrophysiological results after nerve injury in mice treated with vehicle or with M β CD. Results of CMAP amplitude **(A,B)** and latency **(C,D)** recorded in TA and PL at 14, 21, 25, 28, and 33 dpi. Data are shown as the mean and SEM (bars). * $p < 0.05$ with two-way Anova and Bonferroni test. **(E,F)** Pinprick test results to analyze sensory reinnervation in the hindpaw pad C **(E)** and 4th toe **(F)**. Results show the percentage of animals with positive response in each area in the groups treated with vehicle or M β CD. $p < 0.05$ Mantel–Cox test indicate differences in the proportion of mice with reinnervation.

We then studied the effect of cholesterol depletion on peripheral nerve regeneration. To this end, we chose an *in vivo* model of peripheral nerve injury to avoid focusing on a single pathway or molecule, thus gaining a complete view of nerve regeneration. Cholesterol depletion and lipid raft disruption were achieved by means of treatment with M β CD (Zidovetzki and Levitan, 2007), a cyclic oligosaccharide that has been used as an antineoplastic (Grosse et al., 1998) and also as a complexing agent in pharmacological applications (Upadhyay et al., 2006). The latter use of M β CD is attributed to its

amphipathic properties, and molecules can be encapsulated inside the cavity of cyclodextrins. Thus, M β CD may act not only by extracting cholesterol from the plasma membrane and disrupting lipid rafts but also by catalyzing neurotrophic factors and favoring their uptake by neurons or glial cells that play a role in peripheral nerve regeneration. This could explain the increase in the number of GAP43-positive DRG neurons, an observation that indicates that, after M β CD treatment, there are more neurons able to regenerate or that have switched to a regenerative state sooner.

Our results indicate that lipid rafts are disrupted from the cell membrane after M β CD treatment, as shown by the loss of CTxB staining. CTxB has affinity for the GM1 ganglioside, a member of the complex ganglioside family, which also includes GD1 and GT1 (Schnaar et al., 2014), and it has been widely used as a marker of lipid raft integrity (Kalka et al., 2001). It has been reported that treatment with M β CD destabilizes the link between the axon and myelin as a result of the reduction of GD1 and GT1 in the membrane. These two gangliosides act as a myelin-associated glycoprotein receptors (Vyas et al., 2002) and, consequently, they mediate the inhibition of neurite outgrowth. With lipid raft disruption by M β CD, gangliosides are removed from the cell membrane and they cannot mediate the inhibition of neurite outgrowth. This situation may confer the axon with a greater capacity to regenerate. Thus, the increased motor and sensory reinnervation we observed after axotomy and treatment with M β CD is consistent with a reduction of GD1 and GT1 inhibition.

Moreover, other studies have reported that cholesterol removal affects various modes of endocytosis (Rodrigues et al., 2013). Endocytosis is a widely used mechanism for receptor internalization from the cell membrane, and it has been demonstrated that cholesterol and lipid rafts play key roles in clathrin-independent endocytic (Lamaze et al., 2001) and in clathrin-dependent endocytic mechanisms (Rodal et al., 1999). Thus, with lipid raft alteration, endocytosis might be impaired, thereby also remodeling the normal presence or removal of different receptors at the cell surface. With cholesterol depletion by M β CD, the endocytosis of neurotrophic factor receptors may be inhibited (Hausott et al., 2011). As the improvement in motor and sensory regeneration suggests, this inhibition would lead to increased cell receptor availability at cell surface, thus facilitating axon regeneration. On the other hand, M β CD treatment might interfere with myelin as it has a high lipid and cholesterol content. Indeed, deficient cholesterol biosynthesis in oligodendrocytes delays myelination (Saher et al., 2005) and the maximal brain cholesterol synthesis corresponds to the peak of myelination process (Korade and Kenworthy, 2008). However, our results indicate that M β CD treatment did not affect myelination of the regenerated nerve fibers in the adult mice. Nevertheless, a detailed histomorphometric quantification of the regenerated axons might be needed for a quantitative evaluation of the degree of remyelination after lipid raft disruption.

Finally, our results indicate that M β CD treatment accelerates nerve regeneration after complete nerve lesion. The positive effect was detected as faster and higher levels of reinnervation of distal targets, such as plantar muscles, which are the most discriminative for detecting differences in nerve regeneration rate. Whether these results would be more pronounced after a more severe nerve injury requires further attention.

The results of this study shed light on the role of lipid rafts in peripheral nerve regeneration, although more research is needed to elucidate the specific mechanisms affected by lipid raft disruption. As this study was performed from a functional perspective, a number of alterations may have been occurring. On the one hand, we may have accelerated regeneration due to an increase in myelin clearance and thus a decrease in

myelin-associated inhibitory agents. On the other, the beneficial effect might be due to an alteration of membrane ganglioside ratio or because lipid raft disruption promotes an environment that is favorable for neuron regeneration.

In conclusion, we have found that lipid raft disruption increases axonal growth in young neurons *in vitro*, enhances axonal regeneration in two *in vitro* models, and promotes peripheral nerve regeneration. Our results support the notion that these membrane microdomains play an important role in the signaling responsible for determining neural growth during development, as well as for nerve degeneration and regeneration after injury. This could be important because many pathways and molecules are involved in the processes that occur after nerve injury, and the environment plays a key role in the success or failure of nerve regeneration and functional recovery. However, caution should be taken before the translationability of our results. Considering the slow rate of nerve regeneration, in humans with considerable nerve length, target reinnervation may need several months to year. The possible effects of long-term lipid raft disruption treatment pointed above need to be investigated in preclinical models before any potential clinical application.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CR-B, RM-M, and MH-L designed, conducted, and analyzed the *in vitro* experiments. NO, JV, and XN designed, conducted, and analyzed the *in vivo* experiments. CR-B, RM-M, MH-L, and NO wrote the first draft of the manuscript. MP performed the organotypic experiments. AM did percoll gradients to isolated EGL neurons. RM-M, JV, XN, and ES designed the experiments, analyzed the data, and wrote the final version manuscript.

FUNDING

Research in our laboratories was supported by grants from the Spanish MINECO (SAF2016-76340R), CIBERNED, Spanish MECO (FPU14/02156 and BES-2014-067857), TERCEL (RD12/0019/0011) and ERDF funds. It was also supported by the European Union FPT-ICT projects NEBIAS (contract number FP7-611687), EPIONE (FP7-602547), and FP7-NMP MERIDIAN 280778.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00040/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Electrophysiological, locomotion and algimetry tests performed after vehicle or M β CD treatment in uninjured mice. **(A–D)** Electrophysiological results in mice. Results of CMAP amplitude **(A,B)** and latency **(C,D)** recorded in TA and PL muscles at 7, 14, 21, and 28 days after beginning of treatment. **(E)** Plot of the SFI obtained in walking track test. **(F)** Algimetry test results during the 4 weeks of treatment.

REFERENCES

- Ale, A., Bruna, J., Calls, A., Karamita, M., Haralambous, S., Probert, L., et al. (2016). Inhibition of the neuronal NF κ B pathway attenuates bortezomib-induced neuropathy in a mouse model. *Neurotoxicology* 55, 58–64. doi: 10.1016/j.neuro.2016.05.004
- Allodi, I., Udina, E., and Navarro, X. (2012). Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog. Neurobiol.* 98, 16–37. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.005
- Amsalem, M., Poilbout, C., Ferracci, G., Delmas, P., and Padilla, F. (2018). Membrane cholesterol depletion as a trigger of Nav1.9 channel-mediated inflammatory pain. *EMBO J.* 37:e97349. doi: 10.15252/embj.201797349
- Bjorkhem, I., and Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815. doi: 10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b
- Bolard, J. (1986). How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta* 864, 257–304. doi: 10.1016/0304-4157(86)90002-X
- Bruna, J., Udina, E., Ale, A., Vilches, J. J., Vynckier, A., Monbaliu, J., et al. (2010). Neurophysiological, histological and immunohistochemical characterization of bortezomib-induced neuropathy in mice. *Exp. Neurol.* 223, 599–608. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.02.006
- Cahuzac, N., Baum, W., Kirkin, V., Conchonaud, F., Wawrezynieck, L., Marguet, D., et al. (2006). Fas ligand is localized to membrane rafts, where it displays increased cell death-inducing activity. *Blood* 107, 2384–2391. doi: 10.1182/blood-2005-07-2883
- Casals-Diaz, L., Vivo, M., and Navarro, X. (2009). Nociceptive responses and spinal plastic changes of afferent C-fibers in three neuropathic pain models induced by sciatic nerve injury in the rat. *Exp. Neurol.* 217, 84–95. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.01.014
- Cobianchi, S., de Cruz, J., and Navarro, X. (2014). Assessment of sensory thresholds and nociceptive fiber growth after sciatic nerve injury reveals the differential contribution of collateral reinnervation and nerve regeneration to neuropathic pain. *Exp. Neurol.* 255, 1–11. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.02.008
- de Chaves, E. I., Rusinol, A. E., Vance, D. E., Campenot, R. B., and Vance, J. E. (1997). Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. *J. Biol. Chem.* 272, 30766–30773. doi: 10.1074/jbc.272.49.30766
- Decker, L., and French-Constant, C. (2004). Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. *J. Neurosci.* 24, 3816–3825. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5725-03.2004
- del Rio, J. A., and Soriano, E. (2010). Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration. *Nat. Protoc.* 5, 217–226. doi: 10.1038/nprot.2009.202
- Dietschy, J. M., and Turley, S. D. (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 105–112. doi: 10.1097/00041433-200104000-00003
- Ferrari, L. F., and Levine, J. D. (2015). Plasma membrane mechanisms in a preclinical rat model of chronic pain. *J. Pain* 16, 60–66. doi: 10.1016/j.jpain.2014.10.007
- George, K. S., and Wu, S. (2012). Lipid raft: a floating island of death or survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 311–319. doi: 10.1016/j.taap.2012.01.007
- Golub, T., Wacha, S., and Caroni, P. (2004). Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 542–550. doi: 10.1016/j.conb.2004.08.003
- Goodrum, J. F. (1991). Cholesterol from degenerating nerve myelin becomes associated with lipoproteins containing apolipoprotein E. *J. Neurochem.* 56, 2082–2086. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb03469.x
- Goritz, C., Mauch, D. H., and Pfrieger, F. W. (2005). Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 190–201. doi: 10.1016/j.mcn.2005.02.006
- Grosse, P. Y., Bressolle, F., and Pinguet, F. (1998). Antiproliferative effect of methyl-beta-cyclodextrin in vitro and in human tumour xenografted athymic nude mice. *Br. J. Cancer* 78, 1165–1169. doi: 10.1038/bjc.1998.648
- Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B., and Zheng, J. Q. (2004). Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* 42, 51–62. doi: 10.1016/S0896-6273(04)00157-6
- Hausott, B., Rietzler, A., Vallant, N., Auer, M., Haller, I., Perkhofer, S., et al. (2011). Inhibition of fibroblast growth factor receptor 1 endocytosis promotes axonal branching of adult sensory neurons. *Neuroscience* 188, 13–22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.04.064
- Head, B. P., Patel, H. H., and Insel, P. A. (2014). Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 532–545. doi: 10.1016/j.bbame.2013.07.018
- Kalka, D., von Reitzenstein, C., Kopitz, J., and Cantz, M. (2001). The plasma membrane ganglioside sialidase cofractionates with markers of lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 989–993. doi: 10.1006/bbrc.2001.4864
- Kamiguchi, H. (2006). The region-specific activities of lipid rafts during axon growth and guidance. *J. Neurochem.* 98, 330–335. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03888.x
- Kappagantula, S., Andrews, M. R., Cheah, M., Abad-Rodríguez, J., Dotti, C. G., and Fawcett, J. W. (2014). Neu3 sialidase-mediated ganglioside conversion is necessary for axon regeneration and is blocked in CNS axons. *J. Neurosci.* 34, 2477–2492. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4432-13.2014
- Korade, Z., and Kenworthy, A. K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55, 1265–1273. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.02.019
- Lamaze, C., Dujecourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell.* 7, 661–671. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00212-X
- Leitinger, B., and Hogg, N. (2002). The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J. Cell Sci.* 115(Pt 5), 963–972.
- Merris, M., Kraeft, J., Tint, G. S., and Lenard, J. (2004). Long-term effects of sterol depletion in *elegans*, C: sterol content of synchronized wild-type and mutant populations. *J. Lipid Res.* 45, 2044–2051. doi: 10.1194/jlr.M400100-JLR200
- Navarro, X. (2016). Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview. *Eur. J. Neurosci.* 43, 271–286. doi: 10.1111/ejn.13033
- Ormerod, K. G., Rogasevskaia, T. P., Coorssen, J. R., and Mercier, A. J. (2012). Cholesterol-independent effects of methyl-beta-cyclodextrin on chemical synapses. *PLoS One* 7:e36395. doi: 10.1371/journal.pone.0036395
- Pristera, A., Baker, M. D., and Okuse, K. (2012). Association between tetrodotoxin resistant channels and lipid rafts regulates sensory neuron excitability. *PLoS One* 7:e40079. doi: 10.1371/journal.pone.0040079
- Rishal, I., and Fainzilber, M. (2014). Axon-soma communication in neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 32–42. doi: 10.1038/nrn3609
- Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., and Sandvig, K. (1999). Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol. Biol. Cell* 10, 961–974. doi: 10.1091/mbc.10.4.961
- Rodrigues, H. A., Lima, R. F., Fonseca, C., Mde Amaral, E. A., Martinelli, P. M., Naves, L. A., et al. (2013). Membrane cholesterol regulates different modes of synaptic vesicle release and retrieval at the frog neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2978–2987. doi: 10.1111/ejn.12300
- Romeo-Guitart, D., Fores, J., Herrando-Grabulosa, M., Valls, R., Leiva-Rodríguez, T., Galea, E., et al. (2018). Neuroprotective drug for nerve trauma revealed using artificial intelligence. *Sci. Rep.* 8:1879. doi: 10.1038/s41598-018-19767-3
- Ros, O., Cotrufo, T., Martínez-Marmol, R., and Soriano, E. (2015). Regulation of patterned dynamics of local exocytosis in growth cones by netrin-1. *J. Neurosci.* 35, 5156–5170. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0124-14.2015
- Saghy, E., Szoke, E., Payrits, M., Helyes, Z., Borzsei, R., Erotyak, J., et al. (2015). Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca²⁺-gating of transient receptor potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Pharmacol. Res.* 100, 101–116. doi: 10.1016/j.phrs.2015.07.028
- Saher, G., Brugger, B., Lappe-Siefke, C., Mobius, W., Tozawa, R., Wehr, M. C., et al. (2005). High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.* 8, 468–475. doi: 10.1038/nn1426
- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., and Schachner, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{fyn} and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 169, 341–354. doi: 10.1083/jcb.200409127
- Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R., and Hildebrandt, H. (2014). Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development,

- stability, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* 94, 461–518. doi: 10.1152/physrev.00033.2013
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089
- Tassew, N. G., Mothe, A. J., Shabanzadeh, A. P., Banerjee, P., Koeberle, P. D., Bremner, R., et al. (2014). Modifying lipid rafts promotes regeneration and functional recovery. *Cell Rep.* 8, 1146–1159. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.014
- Upadhyay, A. K., Singh, S., Chhipa, R. R., Vijayakumar, M. V., Ajay, A. K., and Bhat, M. K. (2006). Methyl-beta-cyclodextrin enhances the susceptibility of human breast cancer cells to carboplatin and 5-fluorouracil: involvement of Akt, NF-kappaB and Bcl-2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 177–185. doi: 10.1016/j.taap.2006.05.009
- Verdu, E., Buti, M., and Navarro, X. (1996). Functional changes of the peripheral nervous system with aging in the mouse. *Neurobiol. Aging* 17, 73–77. doi: 10.1016/0197-4580(95)02010-1
- Vinson, M., Rausch, O., Maycox, P. R., Prinjha, R. K., Chapman, D., Morrow, R., et al. (2003). Lipid rafts mediate the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 22, 344–352. doi: 10.1016/S1044-7431(02)00031-3
- Vyas, A. A., Patel, H. V., Fromholt, S. E., Heffer-Lauc, M., Vyas, K. A., Dang, J., et al. (2002). Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8412–8417. doi: 10.1073/pnas.072211699
- Zhang, Y. H., Khanna, R., and Nicol, G. D. (2013). Nerve growth factor/p75 neurotrophin receptor-mediated sensitization of rat sensory neurons depends on membrane cholesterol. *Neuroscience* 248, 562–570. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.039
- Zhou, M. H., Yang, G., Jiao, S., Hu, C. L., and Mei, Y. A. (2012). Cholesterol enhances neuron susceptibility to apoptotic stimuli via cAMP/PKA/CREB-dependent up-regulation of Kv2.1. *J. Neurochem.* 120, 502–514. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07593.x
- Zidovetzki, R., and Levitan, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1311–1324. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.03.026

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Roselló-Busquets, de la Oliva, Martínez-Mármol, Hernaiz-Llorens, Pascual, Muhaisen, Navarro, del Valle and Soriano. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

SUPPORTING INFORMATION

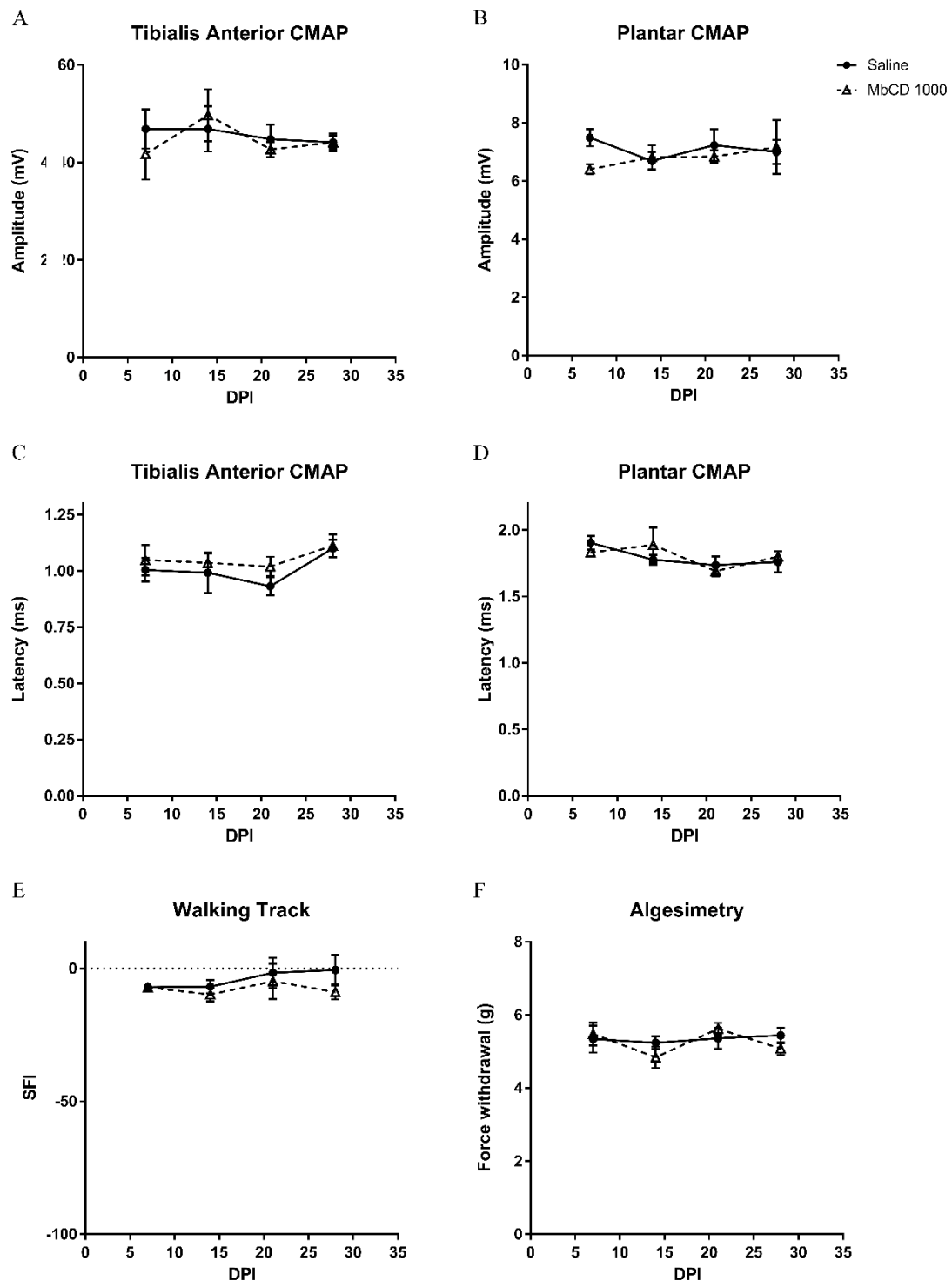


FIGURE S1 | Electrophysiological, locomotion and algesimetry tests performed after vehicle or M β CD treatment in uninjured mice. (A–D) Electrophysiological results in mice. Results of CMAP amplitude (A,B) and latency (C,D) recorded in TA and PL muscles at 7, 14, 21, and 28 days after beginning of treatment. (E) Plot of the SFI obtained in walking track test. (F) Algesimetry test results during the 4 weeks of treatment.

Nystatin regulates axonal extension and regeneration by modifying the levels of nitric oxide.

Cristina Roselló-Busquets^{1,2}, Marc Hernaiz-Llorens^{1,2}, Eduardo Soriano^{1,2,3,*} and Ramón Martínez-Marmol^{4,*}

- (1) Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia i Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya.
- (2) Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa sobre Malalties Neurodegeneratives (CIBERNED), ISCIII, Madrid, Espanya.
- (3) Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Espanya.
- (4) Centre Clem Jones per la Recerca de la demència associada a l'envelliment (CJCADR), Institut Brain Queensland (QBI), Universitat de Queensland, St.Lucia Campus, Brisbane, Queensland 4072, Austràlia.

Resum

La Nistatina és un fàrmac antifúngic àmpliament utilitzat en tractaments d'infeccions orals, cutànies i de mucoses. A més, també s'utilitza per estudiar funcions cel·lulars on participen estructures riques en colesterol, com els *lipid rafts*, degut a la seva capacitat per unir-se i extreure els esterols de la membrana cel·lular. En neurones, els nivells de colesterol estan molt regulats, ja que es una molècula essencial per a la formació de les dendrites i les sinapsis, i per la guia axonal. Tot i així, l'efecte de la Nistatina en la regeneració axonal no s'ha estudiat detingudament. Aquí estudiem el paper d'aquest fàrmac en cultius primaris de neurones d'hipocamp, i demostrem com dosis agudes (minuts) de Nistatina incrementen l'àrea dels conus de creixement, i com dosis cròniques (dies) augmenten el creixement i la ramificació axonal i la regeneració després d'una axotomia.

Descrivim dos vies alternatives responsables d'aquests efectes observats, activades segons la concentració utilitzada de la Nistatina. A concentracions elevades, la Nistatina

augmenta l'àrea dels conus de creixement incrementant la fosforilació d'Akt, mentre que a concentracions baixes promou el creixement i regeneració axonals incrementant els nivells de NO.

Amb aquest estudi concloem que la Nistatina pot actuar a través de dues vies diferents i proposem un nou paper per aquest fàrmac com a regulador de la regeneració axonal.

Aquest article està en procés d'elaboració per ser enviat a publicar.

Nystatin regulates axonal extension and regeneration by modifying the levels of nitric oxide.

Cristina Rosello-Busquets^{1,2}, Marc Hernaiz-Llorens^{1,2}, Eduardo Soriano^{1,2,3,*}, Ramon Martinez-Marmol^{4*}

¹Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology and Institute of Neurosciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), ISCIII, 28031 Madrid, Spain

³Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08010 Barcelona, Spain

⁴Clem Jones Centre for Ageing Dementia Research (CJCADR), Queensland Brain Institute (QBI), University of Queensland, St Lucia Campus, Brisbane, QLD 4072, Australia

*Corresponding authors: Eduardo Soriano, Tel.: +34934037117, esoriano@ub.edu and Ramon Martinez-Marmol, Tel.: +61733463339, r.martinezmarmol@uq.edu.au

Keywords: Nystatin, axon growth, nitric oxide synthase, growth cone, axon regrowth post-axotomy

Short title: Nystatin promotes axon extension and regeneration through NO formation.

ABSTRACT

Nystatin is a pharmacological agent commonly used for the treatment of oral, mucosal and cutaneous fungal infections. Nystatin has also been extensively applied to study the cellular function of cholesterol-enriched structures because of its ability to bind and extract cholesterol from mammalian membranes. In neurons, cholesterol level is tightly regulated, being essential for synapse and dendrite formation, and for axonal guidance. However, the action of Nystatin on axon regeneration has been poorly evaluated. Here, we examine the effect of Nystatin on primary cultures of hippocampal neurons, showing how acute dose (minutes) of Nystatin increases the area of growth cones, and chronic treatment (days) enhances axon length, axon branching and axon regeneration post-axotomy. We describe two alternative signaling pathways responsible for the observed effects, and activated at different concentrations of Nystatin. At elevated concentrations, Nystatin promotes growth cone expansion through phosphorylation of Akt; whereas at low concentrations, Nystatin enhances axon length and regrowth by increasing nitric oxide levels. Together, our findings indicate new signaling pathways of Nystatin and propose this compound as a novel regulator of axon regeneration.

INTRODUCTION

Mammalian adult Central Nervous System (CNS) differs from embryonic CNS and Peripheral Nervous System (PNS) by their inherent ability to regenerate lesioned tissues. After axotomy, the first regeneration step requires the formation of a functional growth cone. Unfortunately, the adult CNS has a reduced capacity to form new growth cones due, to the existence of intrinsic factors (Erturk et al., 2007) and the presence of growth-inhibitory molecules (Tan et al., 2005)(Li et al., 2013). After axotomy, organized sequential steps are required to form new and functional growth cones. The first of which consists of the influx of calcium, that increases exocytosis to fuse additional membrane to form a sealing patch to repair the ablated axon (Bradke et al., 2012)(Blanquie and Bradke, 2018)(Curcio and Bradke, 2018). Following this initial membrane addition, microtubule and actin cytoskeleton are reorganized, multiple signaling cascades are activated and new membrane is transported to the tip of the growing axon (Bradke et al., 2012)(Curcio and Bradke, 2018)(He and Jin, 2016). A tight control of actin cytoskeleton is crucial for the formation and functionality of the new growth cone. Regulation of actin requires the initiation of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt signaling cascade (Jin et al., 2018)(Curcio and Bradke, 2018)(Henle et al., 2011)(Kakumoto and Nakata, 2013)(Berry et al., 2016). Akt phosphorylation induces the activation of nitric oxide synthase (NOS), whose function is associated with actin reorganization and cell survival. NOS produce nitric oxide (NO), a gaseous molecule involved in neurotransmission, neuronal growth and filopodia formation (Van Wagenen and Rehder, 2001)(Welshhans and Rehder, 2005)(Tojima et al., 2009)(Forstermann and Sessa, 2012). NO is also associated with axon regeneration in insects neurons (Stern and Bicker, 2008) and in the snail *Helisoma trivolvis* (Cooke et al., 2013). NO cannot be stored in cells, so its effects depend on the *de novo* synthesis by NOS activity. From the three types of NOS, neural NOS (nNOS) is synthesized in CNS and PNS neurons and its activity is regulated by intracellular calcium levels. The NO downstream signaling pathway involves the activation of protein kinase G (PKG) and actin associated proteins such as the Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP), resulting in a strong reorganization of the actin cytoskeleton (Forstermann and Sessa, 2012)(Zhou and Zhu, 2009) (Cossenza et al., 2014).

Nystatin is a drug commonly used as an antifungal agent because of its ability to destabilize fungal membranes by binding and extracting ergosterol, causing changes in

cell permeability and, eventually, cell lysis (Bolard, 1986)(Coutinho et al., 2004). Nystatin can also bind to cholesterol and extract this lipid from the membranes of mammalian cells. As a consequence, Nystatin has been widely used to disrupt and study the cellular function of lipid rafts. Lipid rafts are membrane microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids, that facilitate the compartmentalization of signaling proteins, working as platforms for spatial and temporal regulation of the cytoskeleton, membrane anchoring and cell adhesion, controlling the motility of growth cones (Guirland and Zheng, 2007), and the regenerative properties of lesioned axons (Tassew et al., 2014)(Rosello-Busquets et al., 2019). The extended clinical use of Nystatin, together with its ability to affect the organization of lipid rafts, make it an ideal candidate to explore its function as a possible therapeutic agent for the treatment of spinal cord lesions.

Here, we performed an *in vitro* evaluation of the Nystatin-induced axonal regenerative properties, analysing the effect of various concentrations and incubation times of this compound in hippocampal neurons. The study of the downstream signaling proteins responsible for the observed effects of Nystatin suggested that Nystatin differentially activates Akt phosphorylation and NO production in a concentration-dependent manner. Our results propose Nystatin as a novel neuronal pharmacological regulator of Akt and nNOS activity that modifies growth cone dynamics and promotes axonal regeneration post-axotomy.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

The following antibodies were used: Mouse Anti-III β -tubulin (MMS-435P, Covance), Rabbit mAb Anti-P-Akt (Ser473) (#4060, Cell Signaling), Goat Anti-Akt (C-20) (sc-1618, Santa Cruz), Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (A-21202, Thermo Fisher), Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (P0217, Dako), Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP (P0449, Dako).

The following drugs and reagents were used: Poly-D-Lysine (P7280, Sigma), laminin (L2020, Sigma), rat tail Collagen Type I, Rat Tail (354236, Corning), Nystatin dihydrate (N4014, Sigma), DMSO (D5879, Sigma), Methyl- β -cyclodextrin (C4555, Sigma), Phalloidin – TRITC (P1951, Sigma), Filipin III (F4767, Sigma), NG-Monomethyl-L-

arginine, monoacetate salt (L-NMMA) (ab120137, Abcam), diamino-fluorescein Diacetate (DAF-FM DA) (D-23844, Molecular Probes), CellTracker™ RedCMTPX Dye (C34552, Thermo Fisher), Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (11697498001, Roche).

Neuronal cultures

Hippocampal and forebrain primary cell cultures and explants were obtained from E16-E17 (embryonic day 16-17) mice embryos. Pregnant CD1 dams were sacrificed by cervical dislocation and the foetuses were collected and decapitated. Brain tissues were maintained during the dissection procedure constantly submerged in ice-cold 0.3% glucose-phosphate-buffered saline (PBS) solution. For primary cell cultures, hippocampi or forebrains were isolated and trypsinized for 6 minutes at 37°C. Trypsin was neutralized with FBS, the tissues were incubated with DNase I for 10 minutes at 37°C, and then they were mechanically dissociated by gentle trituration. The neurons were centrifuged at 800 rpm for 5 min, resuspended and plated in culture glasses pre-coated with 0.5 mg/mL poly-D-lysine. The composition of the neuronal culture medium was Neurobasal (w/o L-glutamine, w/ Phenol Red; 21103-049, GIBCO), 1% penicillin/streptomycin (15140-122, GIBCO), 1% Glutamine (25030-024, GIBCO) and 2% B27 (17504-044, GIBCO). Explants were obtained from dissected hippocampi, plated in 15.6 mm dishes pre-coated culture glasses with 0.5 mg/mL poly-D-lysine (P7280, Sigma) and 0.03 mg/mL collagen (354236, Corning) with neuronal culture medium. Explants were cultured for 3 DIV (3 days *in vitro*) in the experiments of axon extension; or were cultured for 7 or 14 DIV in the experiments of axon regeneration. After 7 or 14 days, axotomy was performed using a hypodermic needle (302200, BD Microlance) to cut the axons close to the explant body (Finn et al., 2000). Axotomized explants were collected using a pipette and moved to a new dish, where they will be immersed in a collagen matrix. When collagen was coagulated, culture media was applied (Lumsden and Davies, 1986) and explants were kept in culture for 3 more days with the corresponding treatments.

Drug treatments

For acute treatment experiments on dissociated forebrain and hippocampal neurons to measure growth cone size, filopodia density, Akt phosphorylation and NO formation, cells were incubated with Nystatin at the following concentrations: 2.5 μ M, 10 μ M or 25 μ M during 30 minutes. DMSO was used as vehicle control condition, applied matching the same volume of Nystatin used.

For chronic treatment experiments on hippocampal explants and dissociated neurons to measure axonal extension and regeneration, the samples were incubated with 2.5 μ M Nystatin or DMSO for 3 days. Nystatin was added to the culture medium immediately after plating dissected neurons (experiments of axon extension) or after axotomy (experiments of axon regeneration).

Nitric oxide experiments

Primary hippocampal neurons were obtained as described above. After 3 DIV, neurons were pre-incubated with 100 μ M L-NMMA or control medium for 1 hour at 37°C. Immediately after, pre-incubation medium was removed and neuronal NO was labelled by incubating with 5 μ M DAF-FM supplemented with 100 μ M L-NMMA or control medium for 30 additional minutes at 37°C. After 3 washes with Neurobasal, neurons were further incubated with 10 μ M CellTracker™ RedCMTPX Dye in addition to 2.5 μ M Nystatin or 0.5 μ M M β CD supplemented with 100 μ M L-NMMA or control medium for 30 minutes at 37°C. CellTracker was used as a marker of the surface of the neurons.

Hippocampal explants were cultured with 100 μ M L-NMMA or control medium for 2h immediately before axotomy was performed. Explants were then returned to their culture medium for 3 additional days in the presence of 2.5 μ M Nystatin or DMSO, supplemented with or without L-NMMA.

Immunocytochemistry

Hippocampal dissociated cultures were fixed with 4% PFA in PBS for 10 minutes at room temperature (RT), permeabilized with 0.1% PBS-Triton for 10 minutes. To detect actin cytoskeleton, neurons were stained with a solution of 1 μ g/mL phalloidin-TRITC in PBS for 30 minutes, rinsed with PBS and mounted in Mowiol. To detect P-Akt, neurons were incubated with blocking solution, 10% normal horse serum (NHS) in PBS, for 2h and with primary antibody diluted in blocking solution for 2h. Then, neurons were washed and incubated with secondary antibody in blocking solution for 1h rinsed with PBS and mounted in Mowiol. To detect cholesterol, neurons were fixed with a solution of 0.12 mM sucrose in 4% PFA in PBS for 15 minutes at RT. Then, neurons were stained with a fresh prepared solution of 0.05mg/mL filipin in PBS for 90 minutes, rinsed with PBS, fixed again with 0.12 mM sucrose in 4% PFA for 20 minutes and mounted in Mowiol (Gu et al., 1997)(Feng et al., 2003).

Explants were fixed with a solution of 4% PFA in PBS or 30 minutes at RT. Then, the explants were rinsed with PBS and permeabilized with a solution of 0.5% triton X-100 in PBS for 30 minutes. Explants were then incubated with blocking solution, NHS 10% in

PBS, for 2h. After blocking, explants were incubated over night at 4°C with the primary antibody diluted in blocking solution. Explants were then washed three times with PBS and incubated with the respective secondary antibodies diluted in blocking solution for 2 h at RT. Finally, explants were washed three times in PBS and mounted in Mowiol.

Immunoblotting

Forebrain neurons were dissected and cultured in 35mm diameter dishes during 3 DIV. On the third day, neurons were treated with control medium (containing DMSO) or Nystatin medium (at different concentrations) for 30 min. After each respective treatment, neurons were placed on ice and lysed with ice-cold lysis buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (11697498001, Roche), 10mM NaF, 1mM Na₃VO₄ and 10mM Na₂H₂P₂O₇. Cell lysates were diluted with loading buffer and boiled for 5 minutes. Samples were separated by electrophoresis using an 8% polyacrylamide gel. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (10600002, GE Healthcare Life Sciences) and incubated with different primary antibody and secondary antibodies. Bands were quantified using GelPro Analyzer software (version 3.1, Media Cybernetics).

Image analysis

Images from explants, growth cones and filopodia were acquired using an epifluorescence microscope (Eclipse Nikon E1000) under a 5x and 10x objective (for explants) or a 60x oil-immersion objective (for growth cones and filopodia). A confocal microscope (Leica TCS SP5) was used to acquire a z-stack of images (every 0.5 µm) from DAF-FM and P-Akt intensity with 63x oil-immersion objective.

Quantifications and Statistical analysis

Each experiment contains a mixed culture of neurons isolated from more than 3 embryos. All experiments were repeated three independent times (independent dissections). In the DAF-FM experiments, the intensity was measured (mean grey value x area) inside the cell body (maximum of Z projections) using ImageJ (Schneider et al., 2012). The measurements were normalized to the signal intensity obtained in control conditions, to avoid basal fluorescence. Between 20 to 30 images were acquired for each condition. In P-Akt images, the intensity was quantified inside growth cones and in the cell body, and was normalized to the control condition. In the explant growth and regeneration experiments, the signal from dapi staining (nuclei) was subtracted from each explant and considered as the beginning of the axons. In 7 DIV explants, the length of eight lines drawn from the beginning of the axons until their most distal part was measured. In 14

DIV explants, the 10 longest axons were selected and their length was measured. For each explant, 8 (in 7 DIV) or 10 (in 14 DIV) axon measurements were obtained and averaged. All the data shown in the graphs represent the mean \pm SEM. The number of neurons and explants used in each experiment is specified into the corresponding figure legend. Data was analyzed using GraphPad software. Normal distribution was evaluated applying the D'Agostino and Pearson normality test. Two-tailed, unpaired Student's *t*-test was used to compare two conditions, and one-way ANOVA with Turkey post-hoc test was used when the experiment had more than two conditions. Significance is considered when **p*-value < 0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

RESULTS

Different doses of Nystatin affect growth cone size.

Growth cones play a key role in axon regeneration and membrane cholesterol levels can modify growth cone dynamics. Nystatin is a polyene antifungal agent widely used in experimental research to alter cholesterol levels and modify the function of lipid rafts. We recently proposed reduction of cholesterol levels as a possible strategy to promote axon regrowth after sciatic nerve lesion (Rosello-Busquets et al., 2019). However, the potential applicability of Nystatin remains unexplored. To answer this question, we first analyzed the effect of different concentrations of Nystatin on growth cone area in hippocampal neurons (Fig. 1). We cultured mice hippocampal neurons for 3 days *in vitro* (3 DIV) and treated them acutely with different widely used concentrations of Nystatin (Johnson et al., 1998)(Koide et al., 2009)(Kim et al., 2013), from high doses that can remove membrane cholesterol (25 μ M) to low doses that do not affect cholesterol levels (2.5 μ M) (Supplemental Fig. 1). Our results showed that all three concentrations tested, 2.5 μ M (Fig. 1 A, D), 10 μ M (Fig. 1 B, E) and 25 μ M (Fig. 1 C, F) increased growth cone area, suggesting a dose-independent effect of Nystatin (Fig. 1 G).

Different doses of Nystatin affect differentially Akt phosphorylation.

The results from Fig. 1 suggest a cholesterol-independent effect of Nystatin in controlling growth cone dynamics. To find out the mechanism through which Nystatin is increasing growth cone size, we studied whether Akt phosphorylation is affected under our three Nystatin concentrations tested. Western Blot analysis of P-Akt/Akt levels from primary cultured forebrain neurons treated with 2.5 μ M, 10 μ M and 25 μ M of Nystatin (Fig. 2 A)

revealed no significant differences, but only a tendency in increasing Akt phosphorylation under the highest dose tested (Fig. 2 B). However, the evaluation of specific P-Akt levels in growth cones and cell bodies by immunocytochemistry assay showed that only the highest doses of Nystatin (10 μ M and 25 μ M) significantly increase Akt phosphorylation locally inside growth cones (Fig. 2 D).

Nystatin increases axon growth in hippocampal explants.

We then wanted to evaluate whether chronic treatments of Nystatin promote axonal growth in hippocampal neurons. To avoid possible toxicity effects of longer exposure to Nystatin, we used the lowest concentration tested (2.5 μ M) which was sufficient to promote a significant increase in on the growth cone size (Fig. 3). Hippocampal explants were cultured inside a collagen matrix with control media (Fig. 3 A) or with 2.5 μ M Nystatin-containing media (Fig. 3 B) for 3 days. The length of explant-protruding axons was analyzed, revealing that chronic exposure to a low concentration of Nystatin promotes axon growth (Fig. 3 C). We then used primary cell cultures of hippocampal neurons (Fig. 3 D, E) to study the chronic effect of 2.5 μ M Nystatin on axonal growth and branching. After 3 days of incubation with Nystatin we found increases on both axon length and axonal branching (Fig. 3 F).

Nystatin increases growth cone area and filopodia density through NO production.

Our results suggest a cholesterol and Akt phosphorylation independent effect on growth cone dynamics by low concentrations of Nystatin in acute (min) and chronic (days) treatments. NO is a gaseous second messenger that participates in actin cytoskeleton remodelling, filopodia formation (Welshhans and Rehder, 2005) and growth cone guidance (Tojima et al., 2009). To evaluate whether the observed effects of low concentrations of Nystatin on growth cones depend on NO production, we incubated hippocampal neurons with a NOS inhibitor (L-NMMA) and detected the formation of NO using Diamino-fluorescein Diacetate (DAF-FM DA), a cell permeable reagent used to quantify low concentrations of NO in solution. DAF-FM DA remains non-fluorescent until it is hydrolysed to DAF-FM by intracellular esterases, allowing its reaction with NO to form a fluorescent benzotriazole. DAF fluorescent intensity was quantified, revealing increased levels of NO upon Nystatin treatment (Fig. 4). The effect of Nystatin in growth cone area (Fig. 5 A) and filopodia density (Fig. 5 B) was prevented by NOS inhibition (Fig. 5 C, D), suggesting NO production as an alternative mechanism used by Nystatin to

modulate axon dynamics at low concentrations. Methyl-beta-cyclodextrin (M β CD) is a compound that, similar to Nystatin, extracts cholesterol from cell membranes, increasing growth cone area and filopodia number (Rosello-Busquets et al., 2019). NO measurement using DAF-FM showed that M β CD treatment did not affect NO production (Supplemental Fig. 2). These results suggest that growth cone area and filopodia number can be modulated by decreasing cholesterol levels or by regulating NO production using low concentrations of Nystatin.

Nystatin increases axon regeneration in immature and differentiated hippocampal explants through NO production.

Previous results showed that Nystatin increases axon regeneration post-axotomy in primary cell cultures of hippocampal neurons (Rosello-Busquets et al., 2019). The ability of axons to regenerate is lost in adult CNS neurons (He and Jin, 2016)(Curcio and Bradke, 2018)(Fawcett, 2019). Primary CNS neuronal cultures lose their regenerative capacities during their *in vitro* differentiation (del Rio and Soriano, 2010). To study whether low concentrations of Nystatin promote axon regeneration post-axotomy and whether this effect is maintained in differentiated neurons, we performed axotomy experiments with hippocampal explants cultured during 7 and 14 DIV (Fig. 6 A, B). Then, axon explants were mechanically ablated and further regrowth for 3 DIV in the presence of 2.5 μ M Nystatin supplemented with the NOS inhibitor L-NMMA (Fig. 6 C-J). Quantification of axon length revealed that Nystatin promotes regrowth of axons after axotomy regardless of the differentiation state of the neuronal cultures, and in a process that requires NO production (Fig. 6 C-K).

DISCUSSION

This study examines the mechanisms through which Nystatin, a drug used normally to treat fungal infections, enhances axonal growth and regeneration using differential dose-dependent mechanism. We demonstrate that only high concentrations of Nystatin increase the size of growth cones through Akt phosphorylation, whereas low concentrations exert the same effect by promoting NO production. The formation of NO is necessary for the chronic effect of Nystatin on modulating axon dynamics and promoting regeneration post-axotomy.

Nystatin can activate Akt phosphorylation in macrophages (Kim et al., 2013), but to date the effect has completely been unexplored in neurons. The combination of Western Blot and immunocytochemistry analysis revealed local growth cone increase of Akt phosphorylation. This effect is specifically localized in growth cones, explaining why it was not detected by Western Blotting. Activation of the PI3K/Akt pathway in growth cones produces an increase of the exocytosis (Laurino et al., 2005), a process necessary for membrane expansion and axon growth (Pfenninger, 2009)(Cotrufo et al., 2011). Although low concentrations of Nystatin also increased growth cone area, they did not enhance Akt phosphorylation. It has been previously described that low doses of Nystatin increases NO levels in macrophage-like cell lines (Koide et al., 2009), but this effect had not been previously described in neurons. Our results are in agreement and suggest an alternative mechanism where Nystatin controls growth cone dynamics by modifying NO levels. These results suggest that depending on its concentration, Nystatin could be acting through different pathways. High doses of Nystatin also remove membrane cholesterol from cell membranes; however, alteration of cholesterol levels does not affect NO production.

There is discrepancy in the literature about the benefits of NO increments on neurites and growth cones. NO is necessary for neurite growth, axon guidance and filopodia length (Van Wagenen and Rehder, 2001)(Welshans and Rehder, 2005)(Cooke et al., 2013)(Sild et al., 2016). However, NO has also been associated to growth cone collapse (Cossenza et al., 2014)(Redondo et al., 2015). This discrepancy could be explained by the fact that NO effects depend on its concentration and the multiple possible interactions with other molecules. While low to moderate increment of NO levels is beneficial for cell survival, high increment of NO concentration is associated with cell death (Cossenza et al., 2014). Our results using NOS inhibitors suggest that the increment of NO induced by Nystatin is required to promote axon regeneration after axotomy.

Under physiological conditions, nNOS is activated by an entry of calcium in the cell (Forstermann and Sessa, 2012). Nystatin extracts sterols from the membranes, promoting the formation of pores selective for monovalent ions such as sodium, potassium and chloride (Korn et al., 1991). The movement of ions along the membrane might alter membrane polarization, activating calcium channels and promoting the increase of calcium concentration that will ultimately activate nNOS.

Disruption of cell membrane permeability has also been associated with the production of reactive oxygen species (ROS). It has been described that an increment in ROS levels

is necessary to initiate axon regeneration after sciatic nerve and spinal cord injury (Hervera et al., 2018), and to regulate F-actin dynamics in the growth cones and neurite outgrowth through Rac1 (Munnamalai and Suter, 2009). NO degradation results in the formation of ROS. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), an enzyme that converts superoxide radicals to molecular oxygen and hydrogen peroxide, are associated with increments of growth cone area, filopodia density, axonal growth and branching in adult motor neurons due to the accumulation of ROS (Osiking et al., 2019). The formation of ROS as secondary sub-products of NO formation could be involved in the observed phenotype after Nystatin treatments.

In conclusion, here we demonstrate that Nystatin could activate two different pathways in neurons, PI3K/Akt and nNOS/NO, and that nNOS activity is necessary for axonal regeneration when Nystatin is applied chronically at 2.5 μ M. With this study we propose that Nystatin, a drug currently used as antifungal agent and to extract cholesterol from the cell membranes, might have an alternative effect improving axon growth and regeneration. Our findings suggest Nystatin as an interesting candidate molecule to be tested in neuronal re-growth and repair.

AUTHOR CONTRIBUTION

R.M-M., C.R-B. and E.S. designed the research. C.R-B. and M.H-Ll performed the experiments. R.M-M., C.R-B and M.H-Ll analyzed the data. R.M-M., C.R-B., M.H-Ll and E.S. made the figures and wrote the manuscript. R.M-M. and E.S. supervised the study.

FUNDING AND ACKNOWLEDGEMENTS

Research in our laboratories was supported by grants from the Spanish MINECO (SAF2016-76340R), CIBERNED and the Spanish MECD (FPU14/02156 and BES-2014-067857). We thank Rachel Gormal from QBI for her comments of the manuscript. We thank Julien Collombelli and the scientific staff of the IRB Advanced Digital Microscopy Facility, as well as Maria Calvo and the scientific staff of the CCiT-UB Advanced Optical Microscopy Facility for expert help with microscopy and data analysis.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCES

- Berry, M., Ahmed, Z., Morgan-Warren, P., Fulton, D., and Logan, A. (2016). Prospects for mTOR-mediated functional repair after central nervous system trauma. *Neurobiol. Dis.* 85, 99–110. doi:10.1016/j.nbd.2015.10.002.
- Blanquie, O., and Bradke, F. (2018). Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 51, 60–69. doi:10.1016/j.conb.2018.02.024.
- Bolard, J. (1986). How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta* 864, 257–304. doi:10.1016/0304-4157(86)90002-x.
- Bradke, F., Fawcett, J. W., and Spira, M. E. (2012). Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 183–193. doi:10.1038/nrn3176.
- Cooke, R. M., Mistry, R., Challiss, R. A. J., and Straub, V. A. (2013). Nitric oxide synthesis and cGMP production is important for neurite growth and synapse remodeling after axotomy. *J. Neurosci.* 33, 5626–5637. doi:10.1523/JNEUROSCI.3659-12.2013.
- Cossenza, M., Socodato, R., Portugal, C. C., Domith, I. C. L., Gladulich, L. F. H., Encarnacao, T. G., et al. (2014). Nitric oxide in the nervous system: biochemical, developmental, and neurobiological aspects. *Vitam. Horm.* 96, 79–125. doi:10.1016/B978-0-12-800254-4.00005-2.
- Cotrufo, T., Perez-Branguli, F., Muhaisen, A., Ros, O., Andres, R., Baeriswyl, T., et al. (2011). A signaling mechanism coupling netrin-1/deleted in colorectal cancer chemoattraction to SNARE-mediated exocytosis in axonal growth cones. *J. Neurosci.* 31, 14463–14480. doi:10.1523/JNEUROSCI.3018-11.2011.
- Coutinho, A., Silva, L., Fedorov, A., and Prieto, M. (2004). Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation. *Biophys. J.* 87, 3264–3276. doi:10.1529/biophysj.104.044883.
- Curcio, M., and Bradke, F. (2018). Axon Regeneration in the Central Nervous System: Facing the Challenges from the Inside. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34, 495–521. doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062508.
- del Rio, J. A., and Soriano, E. (2010). Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration. *Nat. Protoc.* 5, 217–226. doi:10.1038/nprot.2009.202.
- Erturk, A., Hellal, F., Enes, J., and Bradke, F. (2007). Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *J. Neurosci.* 27, 9169–9180. doi:10.1523/JNEUROSCI.0612-07.2007.
- Fawcett, J. W. (2019). The Struggle to Make CNS Axons Regenerate: Why Has It Been so Difficult? *Neurochem. Res.* doi:10.1007/s11064-019-02844-y.

- Feng, B., Zhang, D., Kuriakose, G., Devlin, C. M., Kockx, M., and Tabas, I. (2003). Niemann-Pick C heterozygosity confers resistance to lesional necrosis and macrophage apoptosis in murine atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10423 LP-10428. doi:10.1073/pnas.1732494100.
- Finn, J. T., Weil, M., Archer, F., Siman, R., Srinivasan, A., and Raff, M. C. (2000). Evidence that Wallerian degeneration and localized axon degeneration induced by local neurotrophin deprivation do not involve caspases. *J. Neurosci.* 20, 1333–1341.
- Forstermann, U., and Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–37, 837a–837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.
- Gu, J. Z., Carstea, E. D., Cummings, C., Morris, J. A., Loftus, S. K., Zhang, D., et al. (1997). Substantial narrowing of the Niemann–Pick C candidate interval by yeast artificial chromosome complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 7378 LP-7383. doi:10.1073/pnas.94.14.7378.
- Guirland, C., and Zheng, J. Q. (2007). Membrane lipid rafts and their role in axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 621, 144–155. doi:10.1007/978-0-387-76715-4_11.
- He, Z., and Jin, Y. (2016). Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron* 90, 437–451. doi:10.1016/j.neuron.2016.04.022.
- Henle, S. J., Wang, G., Liang, E., Wu, M., Poo, M.-M., and Henley, J. R. (2011). Asymmetric PI(3,4,5)P3 and Akt signaling mediates chemotaxis of axonal growth cones. *J. Neurosci.* 31, 7016–7027. doi:10.1523/JNEUROSCI.0216-11.2011.
- Hervera, A., De Virgiliis, F., Palmisano, I., Zhou, L., Tantardini, E., Kong, G., et al. (2018). Reactive oxygen species regulate axonal regeneration through the release of exosomal NADPH oxidase 2 complexes into injured axons. *Nat. Cell Biol.* 20, 307–319. doi:10.1038/s41556-018-0039-x.
- Jin, E.-J., Ko, H. R., Hwang, I., Kim, B.-S., Choi, J.-Y., Park, K. W., et al. (2018). Akt regulates neurite growth by phosphorylation-dependent inhibition of radixin proteasomal degradation. *Sci. Rep.* 8, 2557. doi:10.1038/s41598-018-20755-w.
- Johnson, E. M., Ojwang, J. O., Szekely, A., Wallace, T. L., and Warnock, D. W. (1998). Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1412–1416. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624486>.
- Kakumoto, T., and Nakata, T. (2013). Optogenetic control of PIP3: PIP3 is sufficient to induce the actin-based active part of growth cones and is regulated via endocytosis. *PLoS One* 8, e70861. doi:10.1371/journal.pone.0070861.
- Kim, D.-H., Rhim, B.-Y., Eo, S.-K., and Kim, K. (2013). Differential regulation of CC chemokine ligand 2 and CXCL8 by antifungal agent nystatin in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 392–396. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.087.

- Koide, N., Naiki, Y., Morikawa, A., Tumurkhuu, G., Dagvadorj, J., Noman, A. S. M., et al. (2009). Nystatin-induced nitric oxide production in mouse macrophage-like cell line RAW264.7. *Microbiol. Immunol.* 53, 295–300. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00118.x.
- Korn, S. J., Marty, A., Connor, J. A., and Horn, R. (1991). “[22] - Perforated Patch Recording,” in *Electrophysiology and Microinjection*, ed. P. M. B. T.-M. in N. Conn (Academic Press), 364–373. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-185257-3.50027-6.
- Laurino, L., Wang, X. X., de la Houssaye, B. A., Sosa, L., Dupraz, S., Caceres, A., et al. (2005). PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J. Cell Sci.* 118, 3653–3662. doi:10.1242/jcs.02490.
- Li, H.-P., Komuta, Y., Kimura-Kuroda, J., van Kuppevelt, T. H., and Kawano, H. (2013). Roles of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in the formation of a lesion scar and axonal regeneration after traumatic injury of the mouse brain. *J. Neurotrauma* 30, 413–425. doi:10.1089/neu.2012.2513.
- Lumsden, A. G., and Davies, A. M. (1986). Chemotropic effect of specific target epithelium in the developing mammalian nervous system. *Nature* 323, 538–539. doi:10.1038/323538a0.
- Munnamalai, V., and Suter, D. M. (2009). Reactive oxygen species regulate F-actin dynamics in neuronal growth cones and neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 108, 644–661. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05787.x.
- Osking, Z., Ayers, J. I., Hildebrandt, R., Skrubber, K., Brown, H., Ryu, D., et al. (2019). ALS-Linked SOD1 Mutants Enhance Neurite Outgrowth and Branching in Adult Motor Neurons. *iScience* 11, 294–304. doi:10.1016/j.isci.2018.12.026.
- Pfenninger, K. H. (2009). Plasma membrane expansion: a neuron’s Herculean task. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 251–261. doi:10.1038/nrn2593.
- Redondo, J., Hares, K., Wilkins, A., Scolding, N., and Kemp, K. (2015). Reductions in kinesin expression are associated with nitric oxide-induced axonal damage. *J. Neurosci. Res.* 93, 882–892. doi:10.1002/jnr.23556.
- Rosello-Busquets, C., de la Oliva, N., Martinez-Marmol, R., Hernaiz-Llorens, M., Pascual, M., Muhaisen, A., et al. (2019). Cholesterol Depletion Regulates Axonal Growth and Enhances Central and Peripheral Nerve Regeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 40. doi:10.3389/fncel.2019.00040.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Sild, M., Van Horn, M. R., Schohl, A., Jia, D., and Ruthazer, E. S. (2016). Neural Activity-Dependent Regulation of Radial Glial Filopodial Motility Is Mediated by Glial cGMP-Dependent Protein Kinase 1 and Contributes to Synapse Maturation in the Developing Visual System. *J. Neurosci.* 36, 5279–5288. doi:10.1523/JNEUROSCI.3787-15.2016.
- Stern, M., and Bicker, G. (2008). Nitric oxide regulates axonal regeneration in an insect

- embryonic CNS. *Dev. Neurobiol.* 68, 295–308. doi:10.1002/dneu.20585.
- Tan, A. M., Zhang, W., and Levine, J. M. (2005). NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. *J. Anat.* 207, 717–725. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00452.x.
- Tassew, N. G., Mothe, A. J., Shabanzadeh, A. P., Banerjee, P., Koeberle, P. D., Bremner, R., et al. (2014). Modifying lipid rafts promotes regeneration and functional recovery. *Cell Rep.* 8, 1146–1159. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.014.
- Tojima, T., Itofusa, R., and Kamiguchi, H. (2009). The nitric oxide-cGMP pathway controls the directional polarity of growth cone guidance via modulating cytosolic Ca²⁺ signals. *J. Neurosci.* 29, 7886–7897. doi:10.1523/JNEUROSCI.0087-09.2009.
- Van Wagenen, S., and Rehder, V. (2001). Regulation of neuronal growth cone filopodia by nitric oxide depends on soluble guanylyl cyclase. *J. Neurobiol.* 46, 206–219.
- Welshans, K., and Rehder, V. (2005). Local activation of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in growth cones regulates filopodial length via protein kinase G, cyclic ADP ribose and intracellular Ca²⁺ release. *Eur. J. Neurosci.* 22, 3006–3016. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04490.x.
- Zhou, L., and Zhu, D.-Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide Biol. Chem.* 20, 223–230. doi:10.1016/j.niox.2009.03.001.

FIGURE LEGENDS

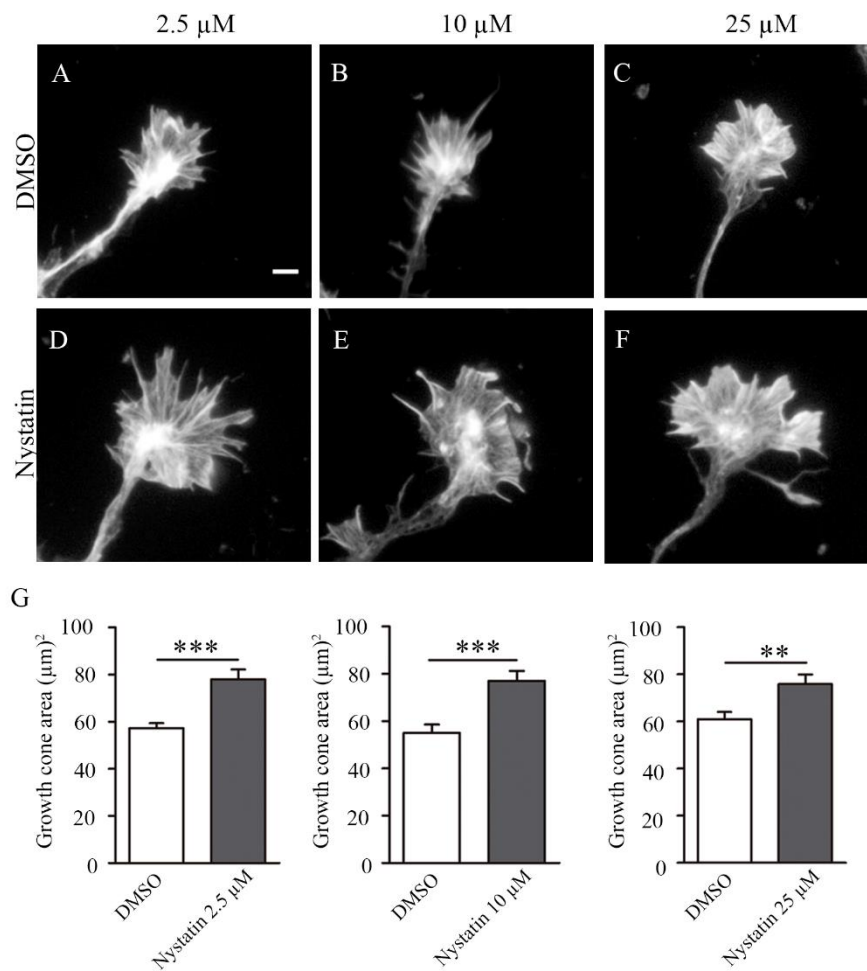


Figure 1. Acute incubation with different concentrations of Nystatin increases growth cone size of hippocampal neurons. Representative images of growth cones from hippocampal neurons cultured during 3 DIV and incubated with control medium (DMSO) (A, B, C) or Nystatin at 2.5 μM (D), 10 μM (E) and 25 μM (F) for 30 minutes. Growth cone area quantification for each treatment (G). Data shows means ± SEM. n=80-120 neurons in each condition. Two-tailed, unpaired Student's *t*-test was performed. ****p*<0.001. Scale bar 5μm.

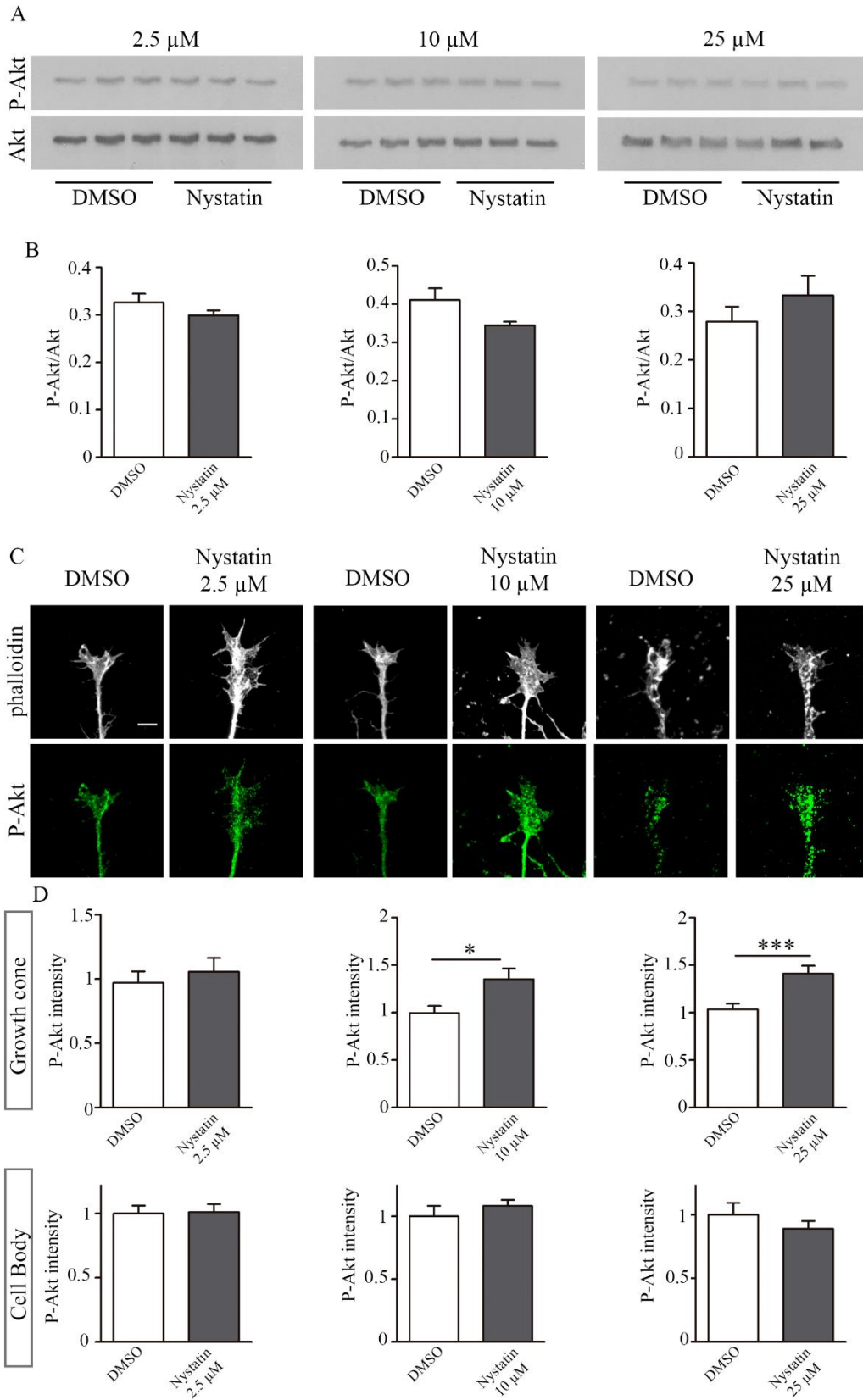


Figure 2. Dose-specific Nystatin effect to Akt phosphorylation. Western blots from E16 cortex primary cell cultures, cultured during 3 DIV and incubated with control medium (DMSO) or Nystatin 2.5 μM, 10 μM or 25 μM during 30 minutes. P-Akt and Akt were detected (A). The ratio

of P-Akt/Akt was quantified with Gelpro software. $n=3$ neuronal extracts in each condition. Two-tailed, unpaired Student's *t*-test was performed (B). Representative images of hippocampal growth cones treated with Nystatin at the doses described above, stained with phalloidin and labeled against P-Akt (C). Quantification of the relative P-Akt intensity in the growth cones and neuronal cell bodies (D). Data shows means \pm SEM. $n=30-50$ neurons in each condition. Two-tailed, unpaired Student's *t*-test was performed. * $p<0.05$, *** $p<0.001$. Scale bar $5\mu\text{m}$.

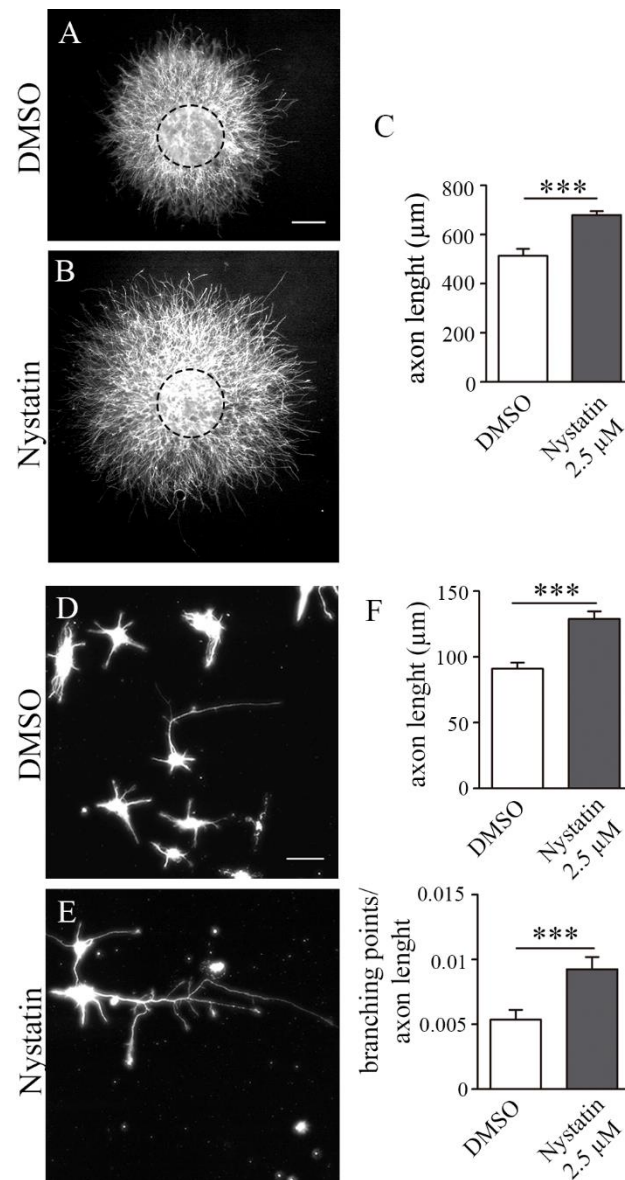


Figure 3. Chronic treatment of Nystatin increases axon length and branching in hippocampal neurons. Representative images of hippocampal explants cultured inside a collagen matrix (A, B) or dissociated neurons (D, E), cultured in the presence of DMSO control media (A, D) or 2.5 μM Nystatin (B, E) for 3 DIV. Axon length quantification from explants (C) or from dissociated neurons (F, upper graph). Quantification of the density of branching points in the axon (F, lower graph). Data shows means ± SEM. n= 15-20 explants, 200 neurons in each condition. Two-tailed, unpaired Student's *t*-test was performed ****p*<0.001. Scale bar 250μm (A, B), 50μm (D, E).

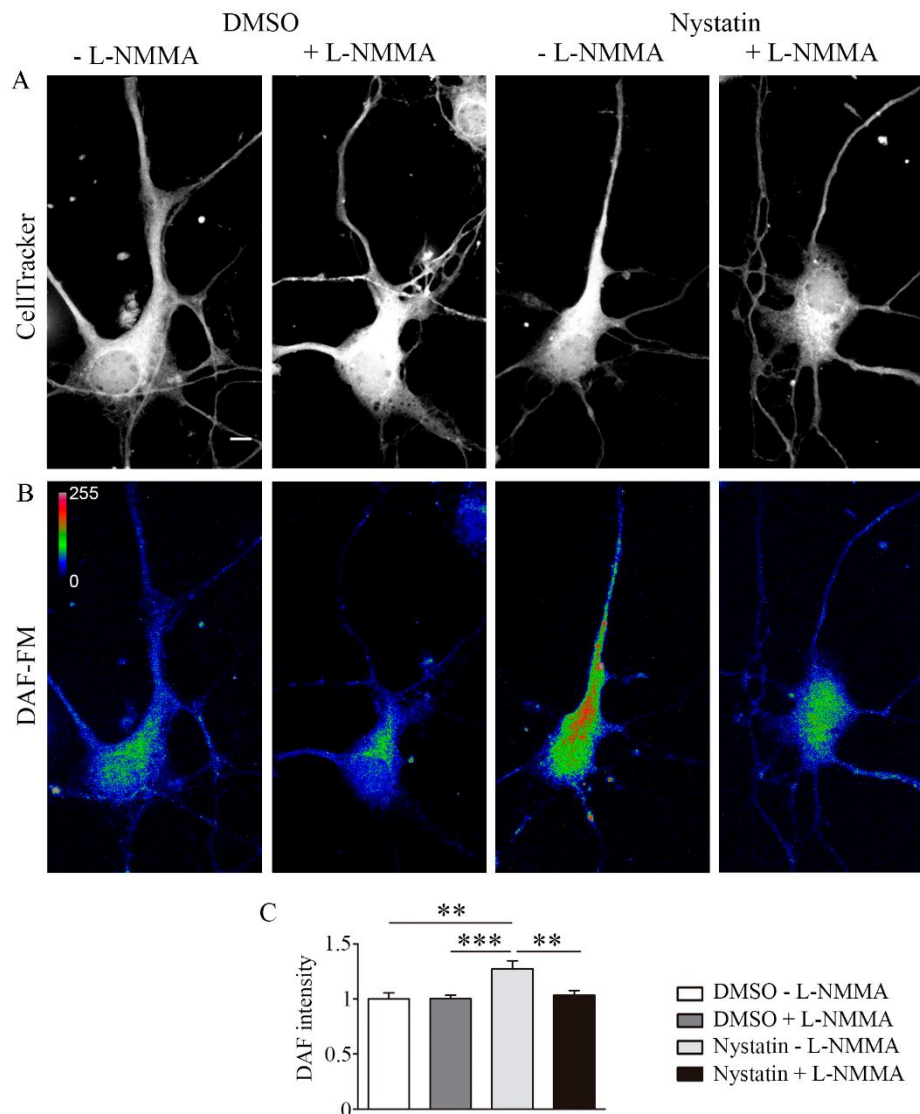


Figure 4. Nystatin increases nitric oxide production in hippocampal neurons. Representative images of hippocampal neurons stained with CellTracker™ Dye (A) and DAF-FM (B) to detect nitric oxide production under the presence of DMSO control conditions (\pm the NOS inhibitor L-NMMA) or 2.5 μ M Nystatin (\pm the NOS inhibitor L-NMMA) incubated during 30 minutes. Images in (B) are shown in a pseudo-color scale where magenta color indicates high levels of NO and blue color indicates low levels of NO. DAF-FM intensity was quantified in each condition and presented relative to DMSO control condition (C). Data shows means \pm SEM. $n= 20-30$ neurons in each condition. One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Scale bar 5 μ m.

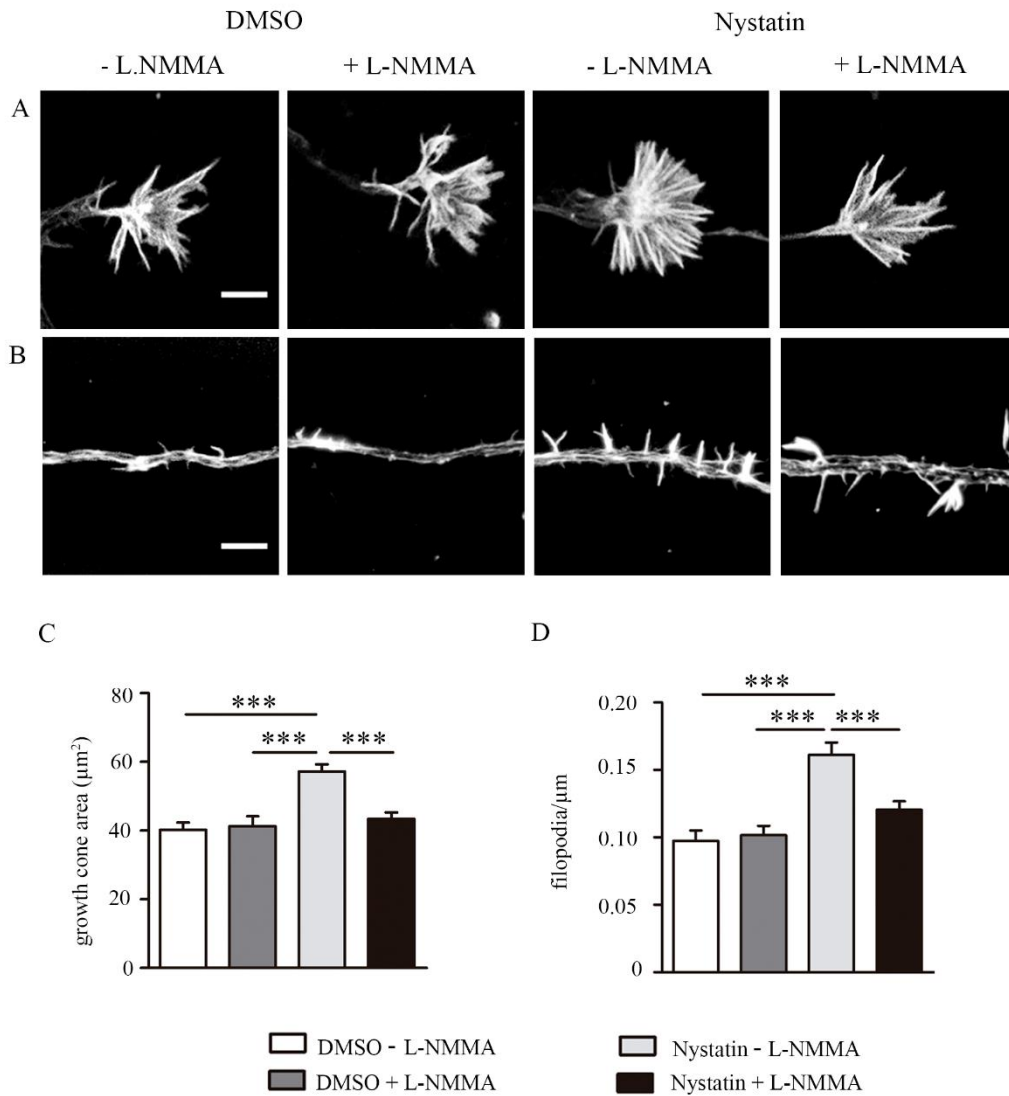


Figure 5. Acute treatment of Nystatin increases growth cone and filopodia density through nitric oxide production. Representative images of growth cones (A) and filopodia (B) treated during 30 min with DMSO (\pm L-NMMA) or 2.5 μ M Nystatin (\pm L-NMMA). Data shows means \pm SEM. n= 20-30 neurons in each condition. One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test; ***p<0.001. Scale bar 5 μ m.

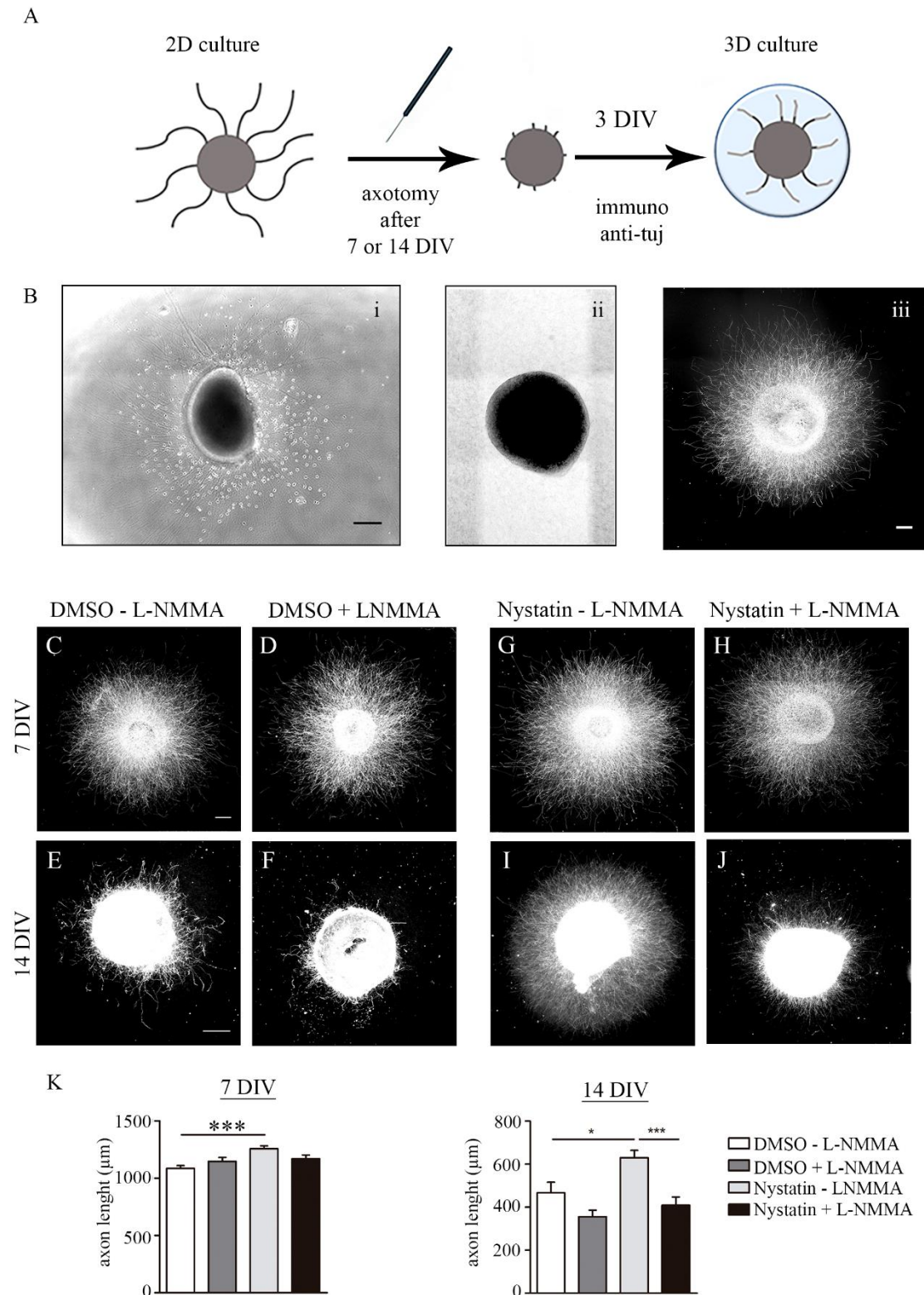
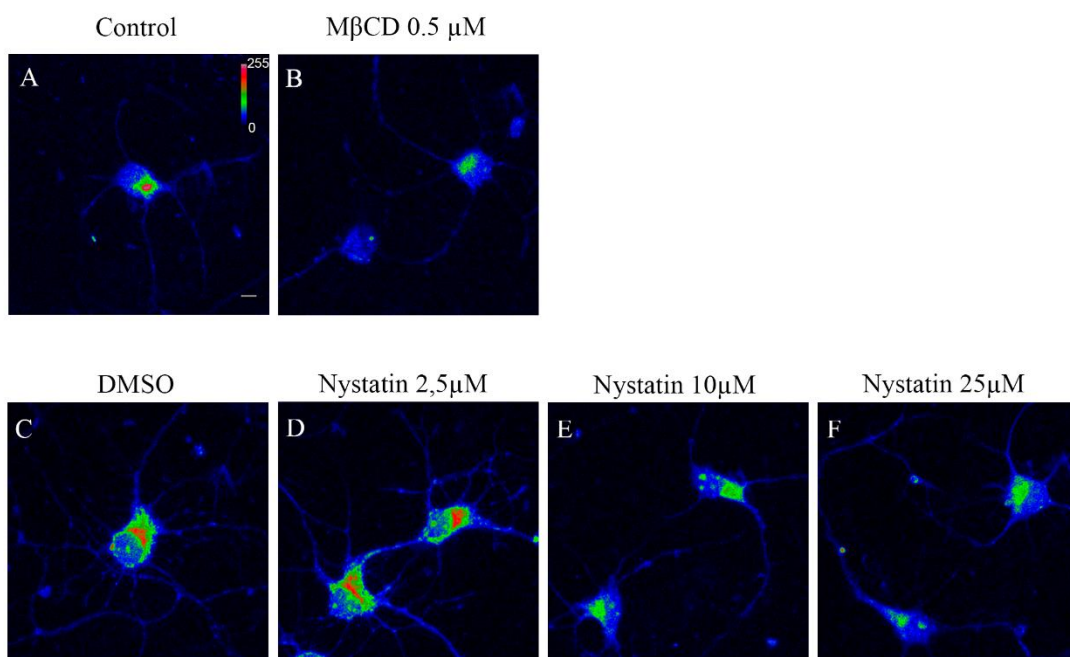
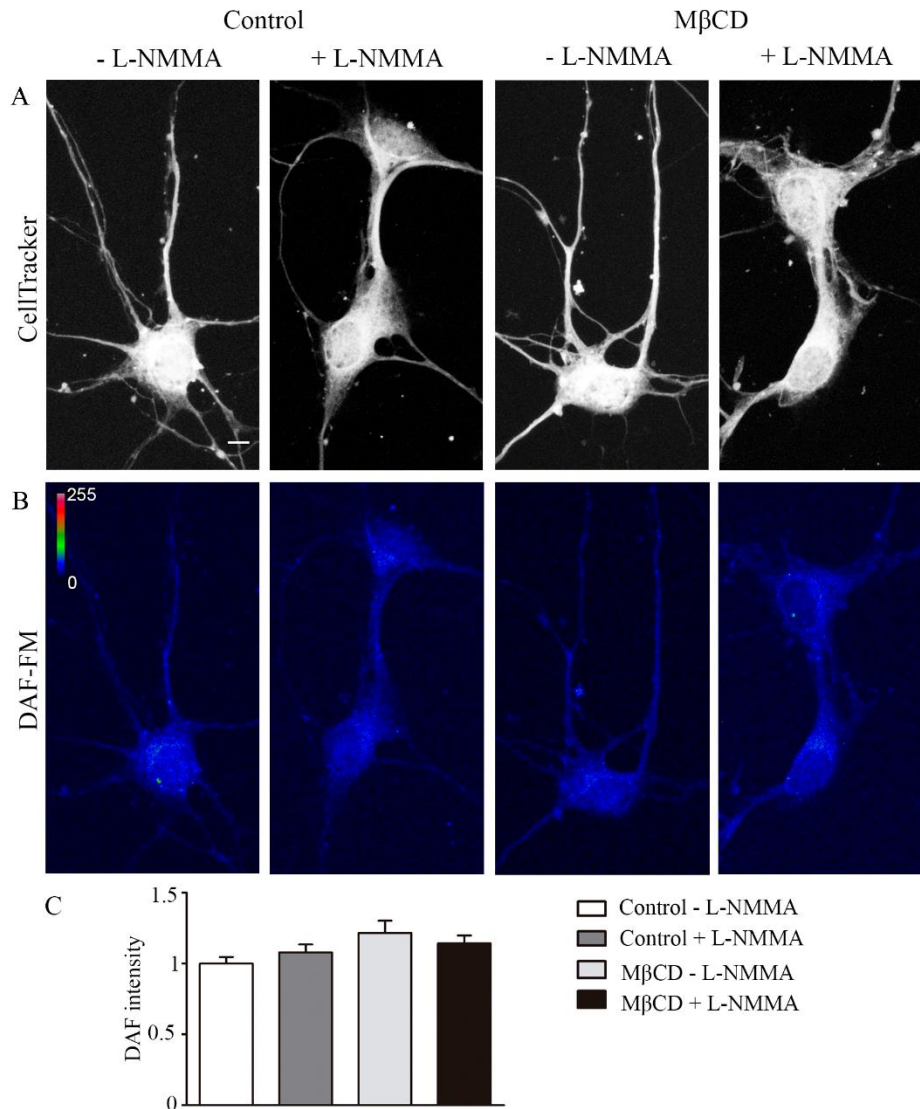


Figure 6. Chronic treatment of Nystatin increases axon regeneration through nitric oxide production. Scheme of axotomy procedure (A). Representative bright field images of explants before axotomy (B i) and immediately after axotomy (B ii). Representative immunofluorescence image of an explant 3 days after axotomy (B iii). Scale bar 200 μm . Representative images of

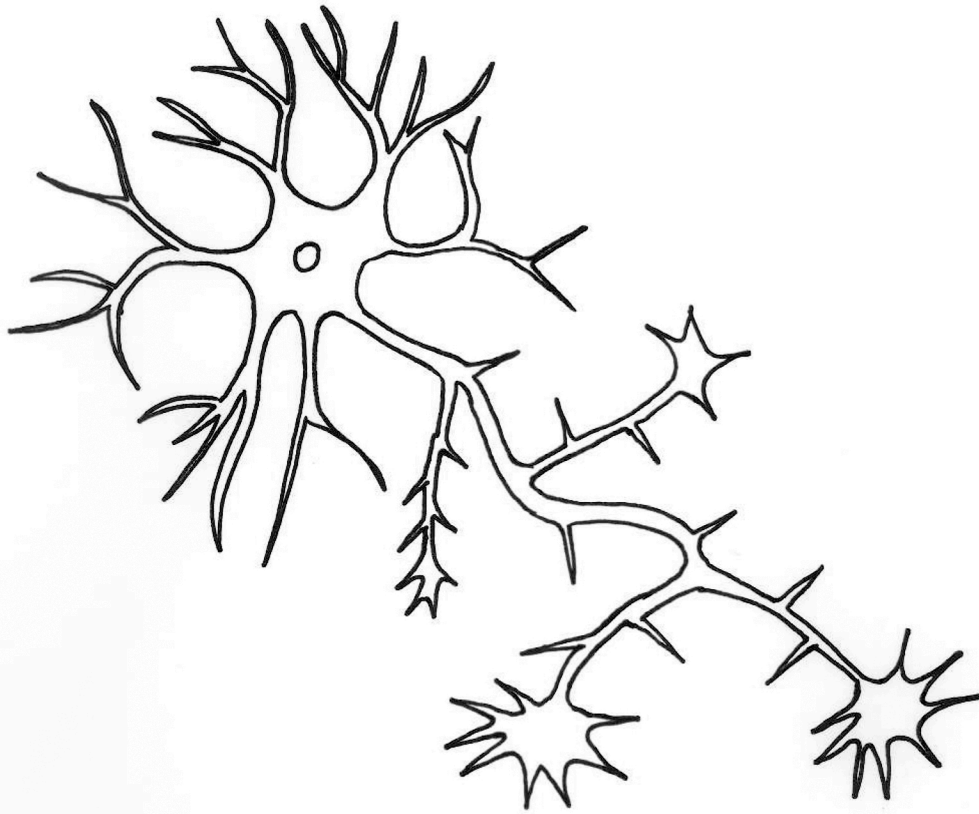
hippocampal explants axotomized after 7 DIV or 14 DIV and regrowth for 3 additional days inside a collagen matrix in control medium (C - F) or 2.5 μ M Nystatin (G - J), and without the NOS inhibitor L-NMMA (C, E, G, I) or with the NOS inhibitor L-NMMA (D, F, H, J). Quantification of explant axon length (K). Data shows means \pm SEM. n= 25-30 explants in each condition. One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test; *p<0.05. Scale bar 250 μ m.



Supplemental Figure 1. Dose-specific Nystatin effect to cholesterol level. Representative images of hippocampal neurons cultured during 3 DIV and incubated with control medium (A, C), M β CD at 0.5 μ M (B), or Nystatin at 2.5 μ M (D), 10 μ M (E) and 25 μ M (F) for 30 minutes. Cholesterol was stained by incubating the neurons with 0.05 mg/mL filipin. Images are shown in a pseudo-color scale where magenta color indicates high levels of cholesterol and blue color indicates low levels of cholesterol.



Supplemental Figure 2. Cholesterol disruption with M β CD does not affect nitric oxide production. Representative images of hippocampal neurons stained with CellTracker™ Dye (A) and DAF-FM (B) to detect nitric oxide production under control conditions (\pm the NOS inhibitor L-NMMA) or 0.5 μ M M β CD (\pm the NOS inhibitor L-NMMA). Images in (B) are shown in a pseudo-color scale where magenta color indicates high levels of NO and blue color indicates low levels of NO. DAF-FM intensity was quantified in each condition and presented relative to control condition (C). Data shows means \pm SEM. n= 20-30 neurons in each condition. One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test. Scale bar 5 μ m.



4. Discussió

1. Guia axonal: estudi de la STX1 en diferents models animals *in vivo*.

Durant els processos de guia axonal participen multitud de factors, molècules i receptors que tenen un efecte directe en el correcte desenvolupament del SN. D'entre tots aquest possibles mecanismes, en aquesta tesi ens hem centrat en les proteïnes SNARE, en concret la STX1.

El paper de les proteïnes SNARE ha estat àmpliament estudiat en processos d'exocitosi durant la neurotransmissió, però recentment s'ha demostrat la seva importància en el tràfic de membrana necessari per l'atracció i la repulsió en processos de guia axonal (Cotrufo et al., 2012)(Barrecheguren et al., 2017)(Rothman et al., 2017)(Li et al., 2019).

Prèviament ja s'havia descrit que la STX1 participa en la quimioatracció dels axons de les neurones comissurals de la medulla espinal i en la migració de les neurones del llavi ròmbic a través de la senyalització de la via Netrina-1/DCC (Cotrufo et al., 2011)(Cotrufo et al., 2012). Aquests estudis però, com la majoria dels realitzats amb proteïnes SNARE, estan fets en cultius *in vitro* i la inhibició d'aquestes proteïnes es solen fer amb tractaments de diferents toxines botulíniques o inhibint la seva expressió mitjançant la transfecció de shRNAs (de l'anglès *small hairpin RNA*) contra gens concrets d'aquestes proteïnes.

La realització d'estudis *in vivo* sobre la funció de la STX1 és complicat degut a la presència de mecanismes compensatoris per part d'altres proteïnes i isoformes capaces de realitzar la mateixa funció i degut a una possible letalitat embrionària en cas que s'aconsegueixi suprimir totalment l'expressió de totes les isoformes presents en l'organisme (Mishima et al., 2014)(Kofuji et al., 2014).

En el primer article d'aquesta tesi, "***A conserved role for Syntaxin-1 in pre- and post-commissural midline axonal guidance in fly, chick, and mouse.***" (Ros et al., 2018), estudiem per primera vegada *in vivo* el paper de diferents SNARE, i en particular de la STX1, en guia axonal en tres models animals d'extensió dels axons de les neurones comissurals: la mosca de la fruita (*Drosophila melanogaster*), el pollastre (*Gallus gallus domesticus*) i el

ratolí (*Mus musculus*). Els resultats obtinguts ens demostren la importància dels mecanismes que regulen el transport de nova membrana per tal que hi hagi una correcta guia axonal i desenvolupament neural, i que la funció de la STX1 com a proteïna clau en la correcta fusió de vesícules al conus de creixement durant el desenvolupament del sistema nerviós s'ha conservat al llarg de l'evolució, mantenint-se invariable en invertebrats i vertebrats.

1.1. Conservació de la STX1 entre espècies.

Entre les diferents espècies, podem comprovar que els mecanismes més importants per la viabilitat dels individus, com per exemple el seu desenvolupament, solen tenir molts factors en comú. La conservació entre espècies de proteïnes importants en el desenvolupament no és un fet sorprenent. Moltes proteïnes de guia axonal estan conservades entre invertebrats i vertebrats, com els Slits i els ROBO i les Netrines i el DCC (Lai Wing Sun et al., 2011)(Blockus and Chédotal, 2016). El fet que haguem vist que la STX1 té la seva funcionalitat conservada en mosca, pollastre i ratolí, ens està deixant entreveure que és una proteïna important pel desenvolupament, que la seva absència compromet la viabilitat de l'organisme, tal i com demostra la letalitat en edat embrionària del KO per les dues isoformes (Mishima et al., 2014), i que segurament estarà conservada també en altres espècies i molt possiblement en altres vies de guia axonal.

1.2. Paper de la STX1 en el desenvolupament de la línia mitja en *D.melanogaster*.

Al silenciar la STX1 en zigots de mosca, es produeixen errors en la guia dels axons longitudinals i comissurals. Es veuen errors de diferent gravetat entre els que destaquen la fallida per arribar a la línia mitja, errors de fasciculació i l'aprimament i col·lapse de les fibres (**Article1.Fig.1**). Els fenotips observats són molt similars als mutants de Slit/ROBO i Netrina-1/DCC (Bhat et al., 2007), cosa que després queda corroborada quan demostrem que hi ha interacció genètica entre la STX1A i aquestes dues vies (**Article1.Fig.8**). Aquest fenotip es repeteix però amb menys gravetat quan es silencien altres SNARE (SNAP25, VAMP2 i Ti-VAMP) (**Article1.Fig.2**). La manca d'alguna d'aquestes proteïnes impedeix la correcta formació del complex SNARE i això pot estar afectant el transport vesicular i en conseqüència l'arribada de receptors a la membrana i de proteïnes reguladores del citoesquelet. Com a conseqüència, és possible que els axons no puguin rebre senyals

extracel·lulars ni remodelar el citoesquelet per projectar-se cap a la font de Netrina. A més, el fenotip observat suggereix que la STX1 és la SNARE que té un paper més important en aquesta via. Els complexos SNARE poden estar formats per diferents combinacions de proteïnes (Winkle and Gupton, 2016)(Wang et al., 2017). És fàcil pensar que poden existir mecanismes de compensació quan falta alguna de les proteïnes que formen un dels complexos, sent la més compromesa la STX1. Això implicaria que en cas que hi faltessin determinades proteïnes integrants del complex SNARE, altres proteïnes podrien suplir la funció que fan, tot i que menys eficientment, i que existeixen mecanismes alternatius i compensatoris amb que les neurones aporten nova membrana plasmàtica durant la guia axonal de les neurones comissurals.

1.3. Paper de la STX1 en el desenvolupament de la medul·la espinal de pollastre i ratolí.

En el cas del pollastre el resultat és molt similar. El silenciament de les SNAREs nombrades anteriorment té lloc per electroporació *in ovo*. Aquesta tècnica permet expressar o silenciar gens *in vivo* en el moment del desenvolupament d'interès i mantenir l'embrió creixent a l'interior de l'ou. La reducció dels nivells d'expressió de les SNARE amb aquest mètode, condueix a la incapacitat dels axons comissurals a arribar a la placa del terra i creuar-la, o bé la creuen però no poden fer el gir rostral. Per tant, aquí es torna a demostrar la importància de la formació del complex SNARE. A més, en els estudis de "llibre obert" podem comprovar que com més aviat en el desenvolupament es silencien aquestes proteïnes, més greus són els fenotips observats (**Article1.Fig.3**). Això suggeriria que el mecanisme de fusió de membranes per les SNARE és rellevant des d'estadis molt primerencs, a l'inici de la formació dels axons, moment en que es necessita una gran aportació de membrana ja que els axons estan creixent (Winkle and Gupton, 2016).

Els estudis histològics fets en ratolins KO de STX 1A/B mostren errors molt semblants als de pollastre (**Article1.Fig.4**). La STX1 forma part del complex SNARE de les vesícules secretores (Rothman et al., 2017), per tant té un paper clau en l'arribada de receptors a la membrana, de proteïnes reguladores del citoesquelet i de la membrana necessària pel creixement (Arantes and Andrews, 2006)(Petkovic et al., 2014)(Vardar et al., 2016)(Fuschini et al., 2018). Al no produir-se correctament el transport vesicular ni l'exocitosi, veiem errors en la guia dels axons comissurals, cosa que demostra que no són capaces de respondre a la senyal

de la Netrina-1 difusible des de la placa del terra, ni a la que actua com a substrat a la zona ventricular (Dominici et al., 2017)(Varadarajan et al., 2017)(Wu et al., 2019). Veiem defasciculació, possiblement degut a la insensibilitat a la Netrina-1 expressada a la zona ventricular; axons que no arriben a la placa del terra, segurament per insensibilitat a la Netrina-1 secretada des de la placa del terra; i altres que envaeixen la zona de les motoneurons un cop l'han creuat, possiblement per insensibilitat a Slit (Blockus and Chédotal, 2016)(Tong et al., 2019).

Resulta important destacar que en els experiments de “llibre obert”, observem com aquest efecte depèn dels nivells d'expressió de les dues STX1 (**Article1.Fig.5**). Mentre que el KO per STX1 A i B té un fenotip més extrem, els KO només per A (que tenen una o dues còpies de la B) tenen un fenotip intermedi, amb errors en la guia axonal però no tan severos com el doble KO. Això ens està indicant que tant la STX1A com la STX1B participen en aquest procés de manera similar i que la STX1B pot compensar part de la pèrdua de la STX1A (Mishima et al., 2014). En el cas de la viabilitat neuronal, en canvi, s'ha descrit que la STX1A i la STX1B tenen rols diferents, sent la STX1B la isoforma que compromet més la supervivència de les neurones (Kofuji et al., 2014). Aquest fet queda reflectit amb la constatació que els ratolins KO de STX1A arriben a l'edat adulta sense cap fenotip visible, mentre que els KO de STX1B no superen els 14 dies de vida (Kofuji et al., 2014). En el nostre estudi estem demostrant la importància en guia axonal de la STX1 en particular, d'entre totes les SNARE, i mostrem que només amb la seva absència ja és suficient per generar errors en la correcta formació de determinats axons de la medul·la espinal.

1.4. Importància de la STX1 en la via de senyalització Slit-2/ROBO, Netrina-1/DCC durant el desenvolupament de la medul·la espinal de pollastre i ratolí.

La interacció genètica demostrada en mosca entre la STX1 i les vies de la Netrina-1/DCC i Slit/ROBO, suggereix l'existència d'una interacció proteica, però no ho demostra. El nostre laboratori va demostrar que DCC i STX1 interaccionen físicament (Cotrufo et al., 2011), però la interacció entre STX1 i ROBO encara no s'ha descrit. Les immunocitoquímiques fetes ens demostren que les diferents SNARE silenciades en els experiments s'expressen en les neurones comissurals, juntament amb ROBO 3 (**Article1.Fig.6**). S'estudia ROBO 3 i no ROBO 1, perquè els errors en guia axonal es donen tant en axons que encara no han creuat la línia mitja, com en els que ja ho han fet. ROBO

3 s'expressa tant abans com després del creuament (Zelina et al., 2014). ROBO 1, en canvi, incrementa l'expressió després del creuament (Blockus and Chédotal, 2016) fet que ens hauria concentrat els errors observats en guia axonal un cop creuada la línia mitja principalment, i no tant abans com després de creuar-la. El fet que les SNARE colocalitzin amb ROBO 3 suggereix una possible interacció entre ambdues proteïnes, però caldria fer experiments de coimmunoprecipitació entre STX1 i ROBO 3 per corroborar aquesta interacció. Ja que ROBO 1 i ROBO 3 presenten una elevada homologia (Blockus and Chédotal, 2016), resultaria interessant estudiar també una possible interacció entre STX1 i ROBO 1.

Per demostrar que els fenotips aberrants observats són deguts a la insensibilitat dels axons a les molècules atractives i repulsives secretades per la placa del terra (Netrina-1 i Slit-2), es van confrontar explants de pollastre electroporats amb shRNA de STX1 amb medi enriquit en Slit-2, i també es van confrontar explants de ratolins KO per STX1A/B amb cèl·lules que secretaven Netrina-1. Com a resultat, vam constatar que l'absència de STX1 generava que aquest axons no responguessin a cap de les dues molècules guia (**Article1.Fig.7**). Cal destacar que els axons dels explants dels ratolins KO per STX1A/B són extremadament curts en comparació al WT. Això demostra, un cop més, la importància d'aquesta proteïna en l'aportació de membrana pel creixement axonal (Arantes and Andrews, 2006)(Winkle and Gupton, 2016)(Petkovic et al., 2014).

Fins ara s'havia demostrat que la STX1 era necessària per l'atracció davant de Netrina-1, però s'havia fet únicament a nivell de cultius primaris de neurones a on es silenciava la proteïna amb shRNAs o s'inhibia amb toxines específiques (Cotrufo et al., 2012). En aquest estudi es demostra aquesta funció de la STX1 per primera vegada a nivell *in vivo*, emprant ratolins KO. A més, aportem nous resultats del paper de la STX1 en una altra via de senyalització, la via de Slit-2/ROBO. Tots aquest resultats junts demostren que la funcionalitat de les proteïnes SNARE, i concretament de la STX1, està conservada en diferents espècies animals i que és necessària per la correcta extensió dels axons de les neurones comissurals durant el desenvolupament de la medul·la espinal.

1.5. Conservació de la funció de la STX1 en altres estructures del SN.

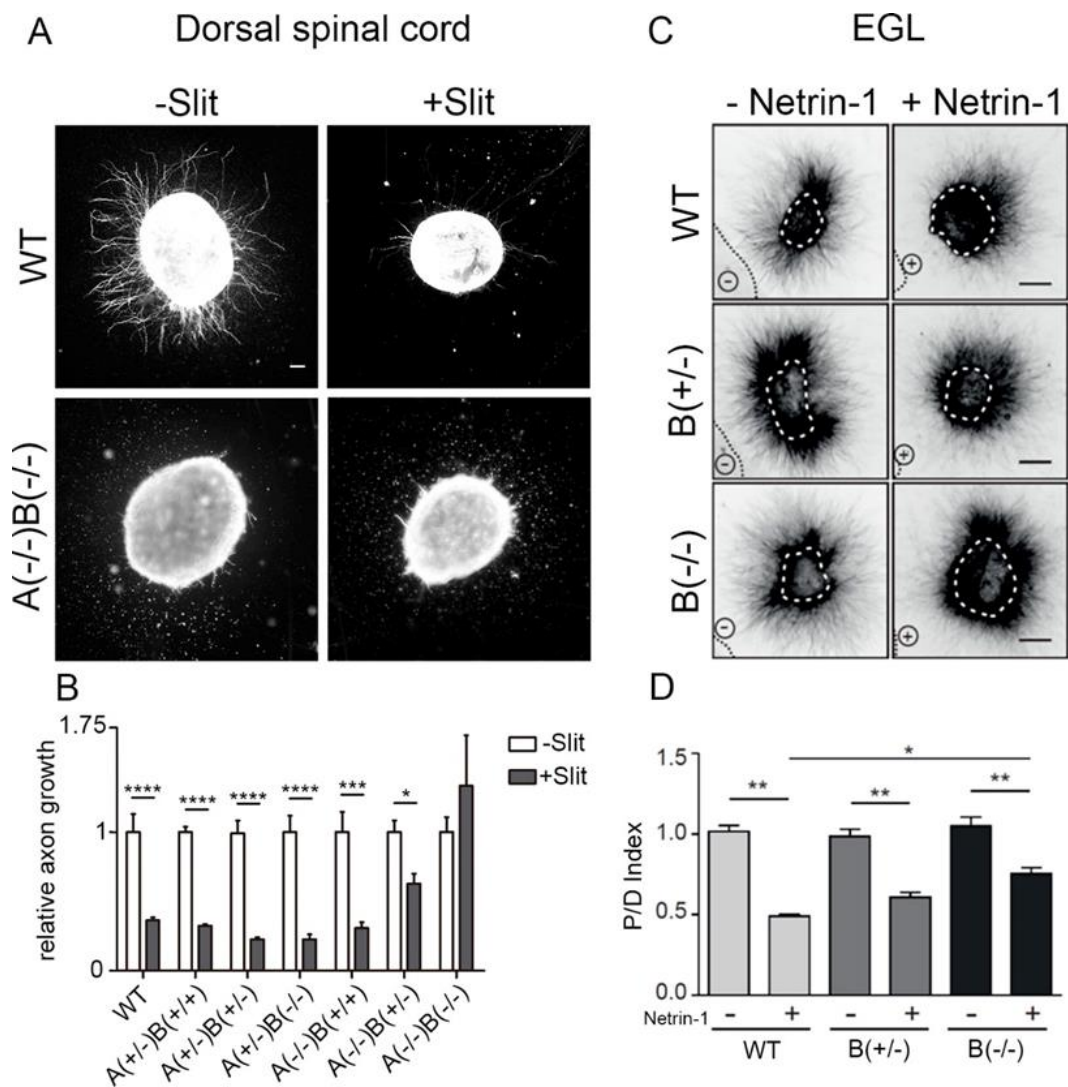


Fig18. La STX1 és necessària per la resposta envers Slit-2 i Netrina-1 en medul·la espinal i EGL de ratolí. (A) Imatges d'explants de la zona dorsal de la medul·la espinal d'embrions de ratolí E11-12 WT (fila superior) i KO per STX1A/B (fila inferior) cultivats en medi control (columna esquerra) o enriquit amb Slit-2 (columna dreta). (B) Quantificació del creixement axonal relatiu. n= 30-50 explants per condició. (two-way ANOVA; ****p<0.0001, ***p<0.001, *p<0.05). (C) Imatges d'explants D'EGL de ratolins P4-5 WT (fila superior), heterozigots de STX1B (fila del mig) i KO per STX1B (fila inferior) confrontats amb cèl·lules que secreten Netrina-1 (columna dreta) o que no en secreten (columna esquerra). (D) Quantificació de la repulsió per P/D ratio. n= 20-30 explants per condició. (t-Test, **p<0.01, *p<0.05) Escala: 100 µm

Metodologia: (A) Es van aïllar explants de la zona dorsal de la medul·la espinal de ratolins E11-12 i es van cultivar dins una matriu col·lagen. Seguidament es van incubar 48h amb Neurobasal suplementat amb penicilina/estreptomicina 1x, Glutamax 1x i B27 1x, o amb el mateix medi enriquit amb Slit-2. Posteriorment els explants van ser fixats amb paraformaldehid 4% i es va fer una immunocitoquímica per detectar la tubulina i poder quantificar la longitud dels axons. (C) Es van aïllar explants de l'EGL de ratolins P4-P5 i es van confrontar amb agregats de cèl·lules HEK293T que expressaven el constructe pCEP4-rNetrin1c-myc i es van cultivar dins una matriu col·lagen tal i com es descriu a (Ros et al., 2018). Els explants es van mantenir 48h *in vitro* amb Neurobasal suplementat amb penicilina/estreptomicina 1x, Glutamax 1x i B27 1x. Posteriorment van ser fixats i es va realitzar la immunocitoquímica tal i com s'ha descrit anteriorment per tal de quantificar la repulsió axonal, calculant la P/D ratio.

El fet que la funció de la STX1 estigui conservada en diferents animals, fa pensar que també pugui estar-ho en diferents estructures del SN. En concret, hem corroborat els resultats demostrats amb els explants de la zona dorsal de medul·la espinal de pollastre, mitjançant experiments amb explants de la mateixa zona dorsal, però de ratolins E11-12 KO per STX 1A/B. De forma anàloga al que succeïa en pollastre, hem vist que el creixement d'aquests axons no es veu afectat per Slit-2 quan falta STX1 (Dades encara no publicades realitzades per C. Roselló, **Fig18.A,B**). La presència d'almenys una còpia de qualsevol de les formes de STX1, ja sigui STX1A o STX1B, és suficient per compensar la pèrdua i garantir la resposta inhibitoria generada cap a Slit-2. L'efecte comença a apreciar-se en el cas del genotip A(-/-)B(+/-), i la pèrdua de resposta a Slit-2 és completa únicament amb el doble KO A(-/-)B(-/-). Aquestes observacions estan en concordança amb els resultats presentats a l'article (Ros et al., 2018), on es descriuen fenotips intermedis quan la pèrdua de STX1 no és total, indicant que hi ha efectes compensatoris de la forma que encara queda funcional. També vam plantejar-nos l'estudi del paper de la STX1 en una altra via on està involucrada la Netrina-1: la repulsió de les EGL, degut a que expressen els receptors UNC5 (Alcantara et al., 2000)(Lai Wing Sun et al., 2011)(Marzban et al., 2014). Concretament, vam disseccionar cerebels de ratolins post-natals (P4-5) KO per STX1B, per aïllar explants d'EGL, i els vam confrontar amb cèl·lules que expressaven Netrina-1 (Dades encara no publicades realitzades per C. Roselló, **Fig18.C,D**). Per aquests experiments vam treballar amb els KO per STX1B i no amb els dobles KO, ja que aquests últims són letals en fases tardanes del desenvolupament embrionari (Kofuji et al., 2014). Els explants KO per STX1B són menys repel·lits que els WT, tot i que no totalment, segurament degut a l'efecte compensatori de la STX1A, però la disminució de la repulsió cap a Netrina-1 és significativa. Aquests resultats suggeririen que la STX1 també és necessària per la repulsió de les EGL a través de la via Netrina-1/UNC5.

Caldria repetir l'experiment amb ratolins KO de STX1A per veure si hi ha diferències entre la STX1A i la STX1B. Aquesta insensibilitat a la Netrina-1 i a Slit-2 com a resultat de l'absència de STX1 pot deure's a diferents causes. Una possible raó seria que sense la presència de STX1, els receptors DCC, UNC5 i ROBO no poden arribar a la membrana plasmàtica per la via secretora i per això els axons no són capaços de respondre ni a Netrina-1 ni a Slit-2 en els diferents models neuronals. Alternativament, si els receptors

ja es troben a la membrana, ja que han sigut transportats per vesícules que van a fusionar-se fent servir altres proteïnes SNARE, la STX1 participaria en l'exocitosi o endocitosi desencadenada com a resposta de la unió de la Netrina-1 o de Slit-2 als seus receptors (Winkle and Gupton, 2016). Tal i com s'ha explicat en la introducció, l'atracció i la repulsió depenen de processos d'exocitosi i endocitosi respectivament (Tojima and Kamiguchi, 2015). S'ha descrit que la manca de STX1 no afecta a l'arribada de DCC a la membrana, i que la Netrina-1 incrementa l'exocitosi a través de la unió de DCC amb STX1 (Cotrufo et al., 2011), per tant això explicaria que la fallida en l'atracció de les neurones comissurals cap a la placa del terra és degut a algun mecanisme en l'exocitosi posterior a l'activació del DCC. Per exemple, podria afectar al transport de proteïnes reguladores del citoesquelet o directament al mecanisme de fusió de membranes degut a la impossibilitat de formar el complex SNARE. En el cas de Slit-2/ROBO i Netrina-1/UNC5, STX1 podria tenir el mateix paper, però afectant l'endocitosi. S'ha descrit que la STX1 interacciona amb la dinamina durant la secreció adrenal (Galas et al., 2000), i que la dinamina participa en la macropinocitosi induïda per SHH (Kolpak et al., 2009). S'ha demostrat que molècules de guia axonal, com la Sema3A, produeixen el col·lapse del conus de creixement a través de la macropinocitosi (Tojima and Kamiguchi, 2015). Durant la macropinocitosi, es produeix l'extensió de pseudòpodes en un procés que requereix de la reorganització del citoesquelet d'actina i d'exocitosi a nivell local, en el que estan involucrades les SNARE com Ti-VAMP (Bajno et al., 2000)(Braun et al., 2004)(Cotrufo et al., 2011). La STX1 podria estar involucrada en l'exocitosi local necessària per l'extensió dels pseudòpodes i dur a terme la macropinocitosi. Això ens podria explicar la manca de repulsió observada en les neurones comissurals i les EGL dels KO per STX1.

1.6. Paper de la STX1 en l'arribada a la membrana de ROBO 3.

Per una altre banda, els nostres resultats aporten nova informació de com afecta la presència de Netrina-1 als nivells d'expressió de ROBO 3 a la membrana plasmàtica i de si la presència de STX1 l'afecta d'alguna manera (**Article1.Fig.Supl.3**). Tal i com he dit anteriorment, mentre que l'absència de STX1 no afecta l'arribada de DCC a la membrana ni varia els nivells d'expressió, la Netrina-1, incrementa l'arribada de DCC a la membrana i l'exocitosi (Cotrufo et al., 2011). Aquí demostrem com en ratolins WT, la Netrina-1 no afecta a l'arribada de ROBO 3 a la superfície dels conus de creixement de les neurones

comissurals. En canvi, la falta de STX1 provoca una disminució de ROBO 3 a la superfície en presència de Netrina-1, ja sigui per dificultats en el transport fins a la membrana o perquè s'internalitza. Aquest fet podria suggerir una exocitosi diferencial de ROBO 3 en presència de Netrina-1 dependent, probablement, de proteïnes SNARE convencionals com STX1. Ja que existeix una elevada homologia entre diferents membres de la família de receptors tipus ROBO (Blockus and Chédotal, 2016), és possible pensar que les observacions descrites per ROBO 3 també passen amb altres ROBO, com ROBO 1. De moment, encara no hem estudiat si la Netrina-1 canvia l'expressió de ROBO 1 a la membrana, però si el mecanisme és anàleg al descrit per ROBO 3, això explicaria la insensibilitat de les neurones comissurals per Slit-2. ROBO 3 té dues isoformes, i una d'elles (ROBO 3.1) ajuda al receptor DCC en la quimioatracció davant de Netrina-1 (Zelina et al., 2014)(Beamish and Kennedy, 2015). El fet que la Netrina-1 faci disminuir encara més l'expressió de ROBO 3 en els KO de STX1 podria estar afectant l'arribada de DCC a la membrana i la seva funcionalitat, que quedaria segregat junt amb ROBO 3 i això reforçaria els resultats observats de manca d'atracció de les neurones comissurals cap a la Netrina-1.

El lligand de ROBO 3 és NELL2, que també és secretada per la placa del terra i produeix repulsió (Jaworski et al., 2015). La dificultat de ROBO 3 per arribar a la membrana quan la STX1 no està present, podria estar afectant a la sensibilitat d'aquestes neurones a aquesta molècula. Per tant, també hauríem de tenir en compte aquesta via juntament amb la insensibilitat a Netrina-1 i Slit-2. Tot junt porta a una incorrecte guia axonal durant la formació de la medulla espinal (Jaworski et al., 2015)(Blockus and Chédotal, 2016)(Wu et al., 2019).

Resumint, els nostres resultats aporten noves maneres d'entendre la funció de les SNARE. Per una banda, demostrem la seva conservació entre espècies, tipus neuronals i vies de senyalització, cosa que ens demostra la gran importància que tenen en el desenvolupament i supervivència dels organismes (Mishima et al., 2014). No es pot descartar que puguin estar participant en altres mecanismes que requereixin de la fusió i transport de membranes (Winkle and Gupton, 2016). Per una altra banda, també demostrem la importància de la STX1 en la guia axonal de les neurones comissurals, implicant dues vies de senyalització diferents (Netrina-1/DCC, Slit-2/ROBO), i de les EGL (Netrina-1/UNC5), degut a la seva participació en la formació del complex SNARE que permet la fusió de

membranes per dur a terme l'exocitosi i l'endocitosi necessàries per a l'atracció i la repulsió (Tojima and Kamiguchi, 2015)(Rothman et al., 2017).

2. Regeneració neural: *lipid rafts*, Akt i NO.

Un dels grans objectius en el camp de la neurociència ha sigut intentar regenerar el SN per tal de poder tractar malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer, l'esclerosi múltiple o el Parkinson, i lesions medul·lars o nervioses després de traumatismes. La incapacitat del SNC per regenerar fa que encara a dia d'avui no es tingui una solució per a totes aquestes malalties i lesions. En aquesta tesi hem estudiat el paper dels *lipid rafts* en la regeneració del SNC i SNP *in vitro* i *in vivo* i, a més, hem profunditzat en el mecanisme d'acció d'un dels fàrmacs utilitzats durant els nostres experiments, la Nistatina. Amb els resultats presentats en aquesta tesi hem pogut comprovar com la modificació de la composició i de la fluïdesa de la membrana controlant els nivells de colesterol presents, té efectes en la morfologia dels conus de creixement, aparició de fil·lopodis i creixement neurític. La composició lipídica condiona l'estructura, la fluïdesa i la forma de la membrana (Ingolfsson et al., 2017)(Casares et al., 2019). La membrana plasmàtica s'ha d'anar remodelant i reciclant per tal de poder créixer, mantenint una composició lipídica específica i alterant els nivells de certs receptors segons les senyals que es rebin de l'exterior (Casares et al., 2019). Tal i com ha quedat demostrat i discutit amb els experiments del primer bloc d'aquesta tesi, el reciclatge dels components membranosos es deu en gran part a les proteïnes SNARE (Rothman et al., 2017). Si el mecanisme funciona correctament i es rep una senyal positiva pel creixement, hi haurà un increment de l'exocitosi, s'aportarà nova membrana i la fluïdesa i la composició d'aquesta variarà. En cas que la senyal sigui repulsiva, es produirà l'efecte contrari. Per tant, les SNARE són importants per la guia, pel creixement, per la retracció de la membrana i pel canvi d'expressió dels receptors a la seva superfície, cosa que farà variar la sensibilitat de la neurona a certes senyals. Fàrmacs que afecten la composició de la membrana per mecanismes diferents provoquen l'activació de cascades de senyalització que promouen el creixement ja sigui degut a la inhibició de l'endocitosi, l'increment de l'exocitosi, la

reorganització del citoesquelet o la manca de funcionalitat dels receptors de molècules d'inhibició del creixement.

Al llarg d'aquesta tesis s'ha fet especial incís en l'alteració d'un element concret de les membranes plasmàtiques, els *lipid rafts*. Hi ha molta controvèrsia sobre el paper que tenen els *lipid rafts* en la regeneració neural. Mentre que hi ha estudis que suporten la idea que són necessaris per tal que un axó pugui regenerar (Santuccione et al., 2005)(Zhang et al., 2013), altres proposen el contrari (Vinson et al., 2003)(Hausott et al., 2011). Aquestes discrepàncies es poden entendre si mirem la gran varietat de receptors que es localitzen en aquests microdominis. S'ha descrit la presència de receptors de molècules atractives de guia axonal i neurotrofines (Netrina-1, BDNF, NGF) (Paratcha et al., 2001)(Guirland et al., 2004)(Kamiguchi, 2006)(Funfschilling et al., 2012)(Pryor et al., 2012) (Fukuda et al., 2015)(Seong et al., 2017), receptors de molècules inhibidores (Semaforines, Nogo, MAG) (Chilton, 2006)(Shelly et al., 2011)(Funfschilling et al., 2012)(Tassew et al., 2014)(Averaimo et al., 2016), proteïnes reguladores del citoesquelet (Rho GTPases, WASP, PIPs) (Guirland and Zheng, 2007)(Chichili and Rodgers, 2009)(Li et al., 2017)(Kalappurakkal et al., 2019), receptors i proteïnes pro-apoptòtiques (FAS/FASL, JNK, PKC, Src) (George and Wu, 2012), així com integrants de cascades de senyalització que promouen el creixement i supervivència cel·lular (Akt) (Grider et al., 2009) (George and Wu, 2012)(Mattei et al., 2015)(Ohtsuka et al., 2017)(Sural-Fehr et al., 2019).

A l'article "***Cholesterol Depletion Regulates Axonal Growth and Enhances Central and Peripheral Nerve Regeneration.***" (Rosello-Busquets et al., 2019), demostrem tan *in vitro* com *in vivo* que l'eliminació dels *lipid rafts* incrementa la regeneració de diferents models neuronals, tant en neurones del SNC com en neurones del SNP.

2.1. Impacte del colesterol de membrana en el creixement *in vitro* de les neurones immadures.

Al tractar neurones immadures del SNC (hipocamp i EGL) i del SNP (DRG) amb tres fàrmacs diferents que disminueixen el colesterol de les membranes (la M β CD, la ChOx i la Nistatina) observem un increment en l'àrea dels conus (**Article2.Fig1,3A**), la densitat de fil·lopodis (**Article2.Fig2,3B**), la ramificació i el creixement neurític *in vitro* (**Article2.Fig4**).

El colesterol, degut a la seva estructura, proporciona rigidesa a la membrana (Hussain et al., 2019). Una possible qüestió a tenir en compte és que mitjançant tractaments aguts

(**Article2.Fig1-3**) amb aquests tres fàrmacs estem afectant la composició i la fluïdesa de la membrana (Fernández-Pérez et al., 2018). Al disminuir lleument els nivells de colesterol, la membrana es tornaria més fluida, podent variar la seva morfologia, i això permetria una expansió del conus de creixement i l'aparició de nous fil·lopodis que donarien lloc a més ramificacions (Gov and Gopinathan, 2006).

Aquests tres composts actuen de manera diferent: mentre que la M β CD i la Nistatina s'uneixen al colesterol de la membrana i l'extreuen, la ChOx actua sobre la seva degradació. La varietat en els mecanismes d'acció, juntament a que cada tipus neuronal té una composició lipídica i nivells de colesterol característic (Ingolfsson et al., 2017), pot explicar les diferències en els efectes sobre l'àrea dels conus, els fil·lopodis, la ramificació i el creixement entre els tres models estudiats i el per què un tractament és més efectiu que un altre. Per exemple, s'ha descrit que les neurones d'hipocamp tenen més colesterol a les membranes que les corticals i el mateix tractament amb M β CD té efectes diferents en els dos tipus neuronals: mentre que a les d'hipocamp incrementa el creixement neurític, l'efecte sobre les corticals és l'oposat segurament perquè ja parteixen d'uns nivells baixos de colesterol (Ko et al., 2005). Això ens demostra que la disminució en els nivells del colesterol, sempre dins d'uns límits que permetin la viabilitat cel·lular, poden promoure l'increment del creixement neurític, i que un mateix tractament pot tenir efectes diferents segons el tipus cel·lular degut a la variabilitat dels nivells basals de colesterol presents a la membrana (Funfschilling et al., 2012).

En el cas dels tractaments de més llarga durada, com en els experiments de creixement axonal, ramificació (**Article2.Fig4**) i regeneració (**Article2.Fig5,6**), a part d'afectar la fluïdesa de la membrana, segurament estem afectant la distribució de proteïnes d'adhesió com les integrines, les CAM i les cadherines que afecten l'adhesió cel·lular i que es troben als *lipid rafts* (Leitinger and Hogg, 2002)(Decker and French-Constant, 2004)(Head et al., 2014)(Li et al., 2017)(Kalappurakkal et al., 2019), receptors de molècules repulsives (Chilton, 2006)(Shelly et al., 2011)(Funfschilling et al., 2012)(Tassew et al., 2014)(Averaimo et al., 2016) i altres receptors de molècules d'inhibició del creixement (Tassew et al., 2014). Tot això podria promoure el creixement neurític.

Tots els fenotips observats fan pensar en que s'està modificant el citoesquelet d'actina. Els *lipid rafts* interaccionen amb el citoesquelet d'actina a través de les WASP i altres

proteïnes reguladores com les Rho GPTases i els PIPs (Guirland and Zheng, 2007)(Chichili and Rodgers, 2009). Alteracions en els *lipid rafts* poden estar afectant a la reorganització del citoesquelet i a la polimerització de filaments d'actina, sense descartar que es puguin estar activant altres cascades de senyalització que promoguin el creixement. Una possible explicació a l'increment del creixement podria ser que al eliminar els *lipid rafts*, els filaments d'actina que hi estan ancorats es desestabilitzin, es trenquin els filaments del domini perifèric i de transició, fent que el citoesquelet d'actina es torni més dinàmic. Un citoesquelet d'actina dinàmic afavoreix que els microtúbuls polimeritzin i el domini central avanci (Schelski and Bradke, 2017). El nombre de microtúbuls dinàmics presents a la zona perifèrica del conus de creixement depèn dels arcs d'actina del domini de transició. Per tant, la desorganització dels arcs pot incrementar el nombre de microtúbuls al domini perifèric i per tant la protrusió del conus i el posterior creixement axonal (Schelski and Bradke, 2017). Una altra opció és que s'estigui activant alguna de les proteïnes reguladores del citoesquelet com Rac1 que incrementa la polimerització d'actina i l'estabilització dels microtúbuls, Arp2/3 que incrementa la formació de fil·lopodis, d'intrapodis i de ramificacions o Cdc42 que activa l'ADF/cofilina que augmenta la despolimerització dels filaments d'actina i la seva fragmentació, permetent l'avançament dels microtúbuls (Omotade et al., 2017)(Schelski and Bradke, 2017)(Miller and Suter, 2018). A més, aquesta pot promoure indirectament la polimerització degut a que es creen nous punt de nucleació com a producte de la fragmentació dels filaments d'actina i incrementa el recanvi d'actina augmentant la concentració de G-actina disponible, que es transporta per flux retrògrad mitjançant la miosina fins a l'extrem positiu del filament, on polimeritza (Schelski and Bradke, 2017)(Miller and Suter, 2018).

S'ha demostrat que el flux retrògrad de l'actina és important pel creixement. La disminució dels punts d'ancoratge amb l'ECM provoca una disminució de les forces de tracció que facilita el flux retrògrad de l'actina i l'increment de la velocitat de creixement (Williams, 2008). Moltes proteïnes d'adhesió com les cadherines i les integrines es troben a *lipid rafts* (Li et al., 2017)(Kalappurakkal et al., 2019). També s'ha descrit que la desestabilització de proteïnes d'ancoratge a l'actina, com les espectrines, augmenta la fluïdesa a l'interior del conus i dels axons i això permet que el citoesquelet sigui més dinàmic (Miller and Suter, 2018). La disminució dels colesterol amb els nostres tractaments pot estar desestabilitzant

ambdós factors i, en conseqüència, augmentant el flux d'actina, la dinàmica del citoesquelet i l'increment final del creixement axonal.

El creixement de l'axó està regulat per onades d'actina que es propaguen del soma fins al conus de creixement (Schelski and Bradke, 2017). S'ha demostrat que la miosina1b és la responsable de la propagació d'aquesta onada, de la formació de l'axó, de l'expansió del domini perifèric del conus i del manteniment dels fil·lopodis (Iuliano et al., 2018). Si tal i com s'ha proposat anteriorment, els nostres tractaments poden estar activant alguna de les RhoGTPases, com Rac1 i Cdc42, que regulen l'activitat de les miosines (Shibata et al., 2015)(Han et al., 2015)(Miller and Suter, 2018), la desestabilització dels *lipid rafts*, doncs, podria estar activant la miosina1b de manera indirecta i aquesta, al seu torn, estaria participant en el fenotip que observem sobre els conus, fil·lopodis i creixement axonal.

Un dels fenotips importants a destacar és l'augment dels punts de ramificació. Per a que creixi una ramificació, primer cal que es formi un fil·lopodi (Lewis et al., 2013), cosa que ja observem amb les incubacions de curta durada amb els tres tractaments. Quan aquestes incubacions són durant més temps, observem com aquests fil·lopodis han estat envaïts pel citoesquelet de tubulina i s'han transformat en ramificacions. Per tant, aquests fàrmacs en incubacions més llargues, a part d'afectar el citoesquelet d'actina, també ho fan sobre la tubulina, ja sigui directe o indirectament a través del citoesquelet d'actina. Les ramificacions que observem són de tipus colateral, ja que surten de l'axó principal. Això és important per la regeneració ja que aquest tipus de ramificació incrementa la superfície de la neurona i li permet fer més connexions amb les neurones veïnes (Lewis et al., 2013).

L'augment del conus de creixement, de fil·lopodis i del creixement neurític requereix de l'aportació de nova membrana. Cal doncs, un increment de l'exocitosi i/o una disminució de l'endocitosi. Algunes proteïnes SNARE es localitzen als *lipid rafts*, per exemple SNAP25, SNAP23 o VAMP2, i altres només parcialment, com la STX1 (Salaun et al., 2004). Degut a la gran quantitat de proteïnes SNARE presents en les neurones, algunes d'elles no localitzades a *lipid rafts*, és possible que la disminució de colesterol no estigui afectant a l'exocitosi o inclús que l'estigui incrementant per una via independent a les SNARE, o de SNAREs que no es localitzen a *lipid rafts*. Per exemple, l'activació de la PI3K i de Cdc42 incrementen l'exocitosi d'aquest tipus de vesícules (Schelski and Bradke, 2017). La miosina1b,

activada per les Rho GTPases, també participa en el transport de les vesícules a través de la via secretora (Almeida et al., 2011). La inserció de nova membrana redueix la tensió i, per tant, promou que els fil·lopodis, els conus i l'axó creixin amb més facilitat (Craig et al., 2012). Per una altre banda, si la disminució del colesterol està augmentant la dinàmica del citoesquelet d'actina, això provoca una estabilització dels microtúbuls i, per tant, un augment del transport vesicular al llarg de l'axó, cosa que comportaria un increment del creixement (Schelski and Bradke, 2017).

Els *lipid rafts* participen en l'endocitosi dependent i independent de clatrina (Rodal et al., 1999)(Lamaze et al., 2001)(Soares et al., 2014)(Wickert et al., 2018)(Kang et al., 2018). Per tant, al eliminar els *lipid rafts*, podem estar inhibint l'endocitosi, sobretot la dependent de caveolina, que està localitzada a *lipid rafts*, i probablement incrementant l'exocitosi, processos que ens porten a un increment d'aportació de membrana i, per tant, del creixement neurític (Pfenninger, 2009).

En resum, la disminució del colesterol pot estar actuant sobre diferents vies per promoure el creixement: pot estar disminuint l'endocitosi, incrementant la dinàmica d'actina a través de molècules reguladores com Rac1, Arp2/3, Cdc42, miosina1b o ADF/cofilina i així promoure la polimerització, l'estabilització dels microtúbuls, el transport vesicular i l'exocitosi (Schelski and Bradke, 2017)(Omotade et al., 2017)(Miller and Suter, 2018). A això cal afegir l'augment de la fluïdesa de membrana i, per tant, la facilitat que això comporta al creixement (Gov and Gopinathan, 2006). D'aquesta manera es promou l'expansió del conus de creixement, la formació de fil·lopodis i ramificacions i l'increment del creixement neurític.

2.2 Paper dels *lipid rafts* en la regeneració del SNC *in vitro*.

Després d'una axotomia, les neurones del SNC no poden regenerar degut a la presència de molècules inhibidores en l'ambient i de la incapacitat de formar un nou conus de creixement (Erturk et al., 2007)(Curcio and Bradke, 2018). Per estudiar si el colesterol és un factor clau per la capacitat regenerativa, vam axotomitzar neurones d'hipocamp després de 7DIV, ja que les neurones són madures i tenen menys capacitat per regenerar (Hilton and Bradke, 2017). Cal tenir present que l'experiment és *in vitro* i, per tant, no estan presents les molècules inhibidores que es trobarien aquestes neurones en l'ambient del

SNC (Duraikannu et al., 2019)(Fawcett, 2019). Així doncs, estem avaluant els factors intrínsecs de les pròpies neurones d'hipocamp i la seva capacitat de formar un nou conus de creixement i estendre l'axó. Vam tractar el cultiu amb el compost que era més eficient en tots els tipus neuronals, la Nistatina, i vam comprovar que augmenta la regeneració (Article2.Fig5). Cal destacar que l'efecte de la Nistatina es dona a nivell local, ja que amb les cambres de microfluids aconseguim que el tractament s'apliqui només a l'extrem dels axons axotomitzats. La disminució del colesterol pot estar actuant sobre dues etapes: la reparació de la membrana i formació del bulb que es forma després d'una axotomia del SNC (Curcio and Bradke, 2018), i/o la velocitat del creixement de l'axó.

Per reparar la membrana plasmàtica cal que disminueixi la seva tensió i així es puguin aproximar els dos extrems de membrana que han estat separats i s'uneixin novament (Hendricks and Shi, 2014). La formació de porus amb liposomes s'ha vist que disminueix la tensió de la membrana i que facilita la seva reparació (Hendricks and Shi, 2014). Els dos fàrmacs utilitzats en els experiments de regeneració *in vitro* i *in vivo* (la Nistatina i la M β CD) produeixen porus a les membranes quan n'arranquen el colesterol. Per tant, és molt probable que estigui disminuint la tensió de la membrana. Una altre manera de reduir la tensió és a través de la fusió de vesícules per exocitosi (Hendricks and Shi, 2014). L'entrada de calci després de la lesió provoca un increment de l'exocitosi regulada per les proteïnes SNARE (Bradke et al., 2012)(Blanquie and Bradke, 2018). La fusió de les vesícules a la membrana fa que augmenti la seva superfície i en conseqüència es redueixi la tensió. Per tant, les SNARE també tindrien un paper important per la regeneració axonal (Hendricks and Shi, 2014). Els tractaments amb Nistatina i M β CD provoquen una permeabilització de la membrana plasmàtica degut a la formació de porus i, com a conseqüència, és molt probable que hi hagi una entrada de calci a l'interior de la neurona suficient per incrementar l'exocitosi, afavorint així la reparació de la membrana i el posterior creixement de l'axó.

Per una altre banda, cal tenir en compte que una membrana amb nivells baixos de colesterol és, per definició, més fluida i per tant la tensió de la membrana és més baixa (Hendricks and Shi, 2014). Això pot ajudar *per se* a la reparació ràpida del trencament de la membrana plasmàtica degut a l'axotomia i disminuir així el dany intracel·lular provocat per l'entrada massiva de calci, associat a una disfunció mitocondrial (Rodemer and Selzer,

2019) o l'activació de cascades d'apoptosi (Kim et al., 2019). D'aquesta manera l'axó podria començar a créixer.

L'altre possibilitat que esmentàvem era que estigués actuant directament sobre el creixement, afectant el citoesquelet d'actina i tubulina i l'exocitosi, tal i com hem vist en l'experiment anterior fet en neurones immadures no lesionades (**Article2.Fig4**). S'ha descrit que l'estabilització dels microtúbuls amb taxol evita la formació del bulb i promou la regeneració axonal (Witte et al., 2008). A més, estudis recents han demostrat que l'activació de l'ADF/cofilina promou la regeneració axonal al SNC (Tedeschi et al., 2019). Tal i com hem discutit anteriorment, els nostres tractaments poden estar incrementant la dinàmica del citoesquelet d'actina, en conseqüència els microtúbuls són més estables i el transport vesicular i l'exocitosi s'incrementen, de manera que l'axó pot regenerar.

Tant si està incrementant la velocitat de reparació del dany, com si s'actua sobre la dinàmica del citoesquelet, el resultat és un increment del creixement després de la lesió.

Per tenir una aproximació més fisiològica i poder veure com afecta l'eliminació dels *lipid rafts* en un model on hi hagi la presència de molècules inhibidores en l'ambient, vam fer cultius organotípics d'escorça entorrinal (EC) i hipocamp que vam deixar envellir i al qual li vam axotomitzar la via perforant que projecta de l'EC cap a l'hipocamp (**Article2.Fig5**). Aquest model és molt utilitzat per estudiar la regeneració del SNC (del Rio and Soriano, 2010). Després de tractar-los durant 10DIV amb Nistatina, vam veure que regeneraven molt més que els no tractats i que, a més, els axons creixien en la direcció correcta. En aquest tipus de cultiu hi ha diferents tipus cel·lulars, entre ells la glia. Després de la lesió, la glia s'activa i allibera molècules inhibidores que afectaran el creixement dels axons (Giger et al., 2010)(Li et al., 2018). En aquest cas, els resultats suggeririen que l'eliminació dels *lipid rafts* afecta a la funcionalitat dels receptors de molècules inhibidores, que juntament amb els efectes sobre els factors intrínsecs, ajuda a que els axons puguin créixer correctament.

Ambdós resultats (l'axotomia de neurones d'hipocamp i dels cultius organotípics) ens demostren que la disminució de colesterol no només incrementa el creixement de les neurones en desenvolupament, sinó que també augmenta la regeneració *in vitro*.

2.3. Paper dels *lipid rafts* en la regeneració del SNP *in vivo*.

Estudis recents demostren que l'eliminació dels *lipid raft* amb un tractament agut que disminueix el colesterol incrementa la regeneració després d'una lesió medul·lar (Tassew et al., 2014). Nosaltres hem estudiat la regeneració del SNP *in vivo* en ratolins que se'ls lesionava el nervi ciàtic i es tractaven durant un mes amb M β CD, ja que hem observat que la Nistatina és tòxica en la formulació que actualment està disponible quan s'administra a nivell intravenós. Vam comprovar que el nostre tractament elimina els *lipid rafts* dels animals tractats i que no afecta a la mielina, composta principalment per colesterol, dels axons regenerats. A més, vam detectar un increment de la proteïna GAP43 en els DRG dels animals tractats amb M β CD, cosa que ens indica que l'eliminació dels *lipid rafts* està activant el programa de regeneració axonal (Curcio and Bradke, 2018)(Fawcett, 2019) (**Article2.Fig7,8**). El fet que la mielina no es vegi afectada pel tractament amb M β CD pot explicar-se perquè amb la síntesi *de novo* endògena de colesterol per part de les cèl·lules de Schwann ja és suficient per remielinitzar un axó regenerat (Goodrum and Pentchev, 1997). A través d'estudis d'electrofisiologia vam demostrar un increment significatiu de la innervació a les parts més distals (a la zona plantar) en els animals tractats respecte els no tractats, i un increment de la sensibilitat en el quart dit del peu a través del test de Pinprick (**Article2.Fig9**). Per tant, els resultats obtinguts *in vitro* en neurones del SNC i SNP recolzen els obtinguts *in vivo* a nivell del SNP. En aquest cas hem de sumar a tot el descrit prèviament, la presència de mielina a l'ambient i la resposta inflamatòria després de la lesió, ambdós factors són inhibitoris pel creixement (Duraikannu et al., 2019)(Duncan et al., 2019)(Fawcett, 2019). S'ha descrit que tractaments amb M β CD després d'una lesió medul·lar incrementen la regeneració axonal degut a la disfunció del receptor Neogenina (Tassew et al., 2014). El tractament amb M β CD després de la lesió del nervi ciàtic incrementa el creixement segurament també gràcies a la deslocalització dels receptors de citoquines pro-inflamatòries alliberades pels macròfags, i dels receptors de molècules que formen part de la mielina del SNP, com MAG, MBP, la glicoproteïna P₀ o la PMP-22, que estan localitzats a *lipid rafts* i que inhibeixen el creixement (Vinson et al., 2003).

L'increment del creixement és una qüestió d'equilibri en el que els factors positius (polimerització de l'actina i tubulina, factors de creixement, excitosi, fluïdesa de

membrana i cascades de senyalització com Akt) guanyen als factors negatius (molècules inhibidores, cascades pro-apoptòtiques, endocitosis). Amb tots aquests resultats demostrem que la disminució de *lipid rafts* a la membrana decanta aquest equilibri a favor del creixement, però calen més estudis per entendre millor el mecanisme sobre el que estem actuant.

No podem subestimar la importància del reciclatge del colesterol de la membrana. La majoria del colesterol sintetitzat *de novo* es forma al reticle endoplasmàtic i s'incorpora a la membrana a través de la via secretora o directament per un transport independent de la formació de vesícules, que és molt ràpid. En mamífers, la vida mitja del colesterol al reticle és de 10-20 minuts (Casares et al., 2019). En els tractaments aguts *in vitro*, hi pot haver incorporació de colesterol nou sintetitzat al reticle endoplasmàtic de les neurones o procedents de la membrana de vesícules intracel·lulars, que no estaríem afectant amb els nostres tractaments. A més en el cas dels experiments *in vivo*, el colesterol també pot ser reciclat dels fragments de mielina provinents de l'axó lesionat o de la glia (Hussain et al., 2019).

Amb el nostre estudi demostrem que amb tractaments aguts per eliminar el colesterol ajudem al creixement i a la regeneració del SNC i SNP *in vitro* i a la regeneració del SNP *in vivo*, però desconeixem els efectes que pot tenir una administració crònica sobre el SN. Alguns estudis descriuen possibles efectes secundaris dels tractaments crònics d'eliminació del colesterol, com per exemple l'aparició de dolor neuropàtic degut a la deslocalització de canals iònics a les neurones sensorials perifèriques (Saghy et al., 2015)(Ferrari and Levine, 2015)(Amsalem et al., 2018). A través d'electrofisiologia, hem demostrat que les nostres dosis de M β CD administrades a nivell sistèmic no afecten la sensibilitat al dolor dels nostres animals (**Article2.FigSupl.1**), ja que no hi ha diferències en la resposta entre el animals tractats i els no tractats amb el fàrmac. Tot i això, cal tenir present que el tractament només ha sigut durant un mes, i no sabem les conseqüències que poden tenir tractaments encara més llargs. Aquests resultats podrien ser prometedors per a persones amb lesions, com a possible tractament post-traumàtic, en el que es podria plantejar una aplicació aguda a través d'infiltracions a la zona lesionada.

2.4. Mecanismes d'acció de la Nistatina.

Dels tres fàrmacs utilitzats per eliminar els *lipid rafts*, vam veure que la Nistatina era la més efectiva. Això ens va fer pensar que possiblement està actuant sobre algun altre mecanisme a part d'estar eliminant el colesterol de la membrana.

En l'article "*Nystatin regulates axonal extension and regeneration by modifying the levels of nitric oxide.*" demostrem com aquest agent farmacològic incrementa l'àrea dels conus de creixement, la densitat de fil·lopodis, el creixement i ramificació axonals i la regeneració, incrementant els nivells de NO.

La Nistatina actua sobre les membranes unint-se als esterols i extraient-los, formant així porus a la superfície cel·lular. Això pot crear una permeabilització i despolarització de la membrana plasmàtica, amb la conseqüent entrada de calci i activació de diferents vies de senyalització. Degut a que estudis fets en macròfags descriuen que la Nistatina incrementa la fosforilació d'Akt i la producció de NO (Koide et al., 2009)(Kim et al., 2013), i que ambdues vies estan implicades en la remodelació del citoesquelet d'actina, la formació de fil·lopodis i el creixement neurític (Van Wagenen and Rehder, 2001)(Welshhans and Rehder, 2005) (Tojima et al., 2009)(Henle et al., 2011)(Forstermann and Sessa, 2012)(Kakumoto and Nakata, 2013)(Berry et al., 2016)(Jin et al., 2018)(Curcio and Bradke, 2018), vam decidir mirar els nivells d'aquestes dues molècules en diferents tractaments aguts amb dosis on havíem vist un increment de l'àrea del conus de creixement (**Article3.Fig1,2,4**). Vam poder comprovar que, segons la dosi de Nistatina amb la que s'incubaven les neurones, s'activava la producció de NO (amb Nistatina 2,5µM) o la fosforilació d'Akt (amb Nistatina 10 µM i 25 µM) a l'interior dels conus de creixement. Això ens està indicant que la Nistatina pot activar dues vies diferents de senyalització segons la dosi a la que s'utilitza i que les dues tenen el mateix fenotip: l'increment de l'àrea del conus. Tant la nNOS com la fosforilació d'Akt poden ser activades per l'entrada de calci (Forstermann and Sessa, 2012)(Petrozziello et al., 2017). És possible que a les dosis baixes, es creïn pocs porus a la membrana i per tant hi ha una entrada lleu de calci suficient per activar nNOS però no suficient com per fosforilar Akt. En canvi, a les dosis més elevades el calci ja actuaria sobre la fosforilació d'Akt a través de la PI3K directament o per mitjà del NO, ja que el NO també pot activar aquesta via (Wei et al., 2008)(Mejia-Garcia et al., 2013)(Eller-Borges et al., 2015). Amb els resultats que tenim fins ara no podem concloure que les dosis més altes de Nistatina afectin la producció de NO.

Caldria repetir els experiments fets amb DAF-FM (*4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate*) a les dosis de 10 i 25 μ M per tal de poder veure si segueix havent l'increment de NO a aquestes dosis. Per poder demostrar que l'increment de NO és el responsable directe de la fosforilació d'Akt, caldria fer experiments mesurant el grau de fosforilació d'aquesta proteïna en presència de l'inhibidor de nNOS, L-NMMA (*N^G-Monomethyl-L-arginine, monoacetate salt*). Una altre possibilitat és que el calci no estigui actuant, i que tant l'activació de nNOS com la fosforilació d'Akt (directe o a través del NO) sigui un efecte directe del fàrmac i no una conseqüència de l'entrada de calci a la cèl·lula. Caldria fer estudis amb quelants de calci o amb marcadors per tal de veure si el calci és un factor clau d'aquest procés, tot i que si fos així, també hauríem d'haver vist un increment de NO amb la M β CD, ja que també fa porus a la membrana i, per tant, també estaria entrant calci a l'interior de la cèl·lula. Però tal i com hem demostrat, la Nistatina és l'únic compost que incrementa els nivells de NO, per tant, semblaria que l'increment de calci per si sol no seria el responsable de l'activació de NOS, sinó que la Nistatina estaria activant aquest enzim a través d'algun altre mecanisme addicional. També caldria veure si la M β CD incrementa la fosforilació d'Akt per tal de poder concloure si és un mecanisme únic de la Nistatina.

Com hem demostrat en l'experiment d'axotomia *in vitro* en cambres de microfluids a l'article del capítol 2 de resultats (Rosello-Busquets et al., 2019), el tractament local de la Nistatina sobre els axons és suficient per induir la regeneració. Això concorda amb els resultats obtinguts en els experiments d'increment de la fosforilació d'Akt en neurones d'hipocamp, on hem comprovat que la Nistatina l'incrementa només a l'interior dels conus, estructura clau per la regeneració (**Article3.Fig2**). Altres estudis també demostren que l'activació de la via PI3K/Akt a l'interior del conus incrementa l'exocitosi de les vesícules PPV, produint una expansió de la membrana i per tant del conus de creixement (Laurino et al., 2005). En el cas de la detecció del NO amb el reactiu DAF-FM, la localització del NO als conus no es veu tan clara (**Article3.Fig4**), degut a que el NO es un gas i difon ràpidament al llarg de la neurona. Tot i així, el fet que el tractament local de Nistatina als extrems dels axons seccionats produeixi regeneració axonal, ja és un indicatiu que l'activació de NOS s'està produint a l'extrem dels axons axotomitzats i que només amb aquest increment localitzat de NO els axons ja són capaços de regenerar.

2.5. Importància del NO en el creixement i regeneració axonal.

En els experiments amb incubacions més llargues (creixement, ramificació (**Article3.Fig3**) i regeneració (**Article3.Fig6**)) només s'ha utilitzat la dosi de Nistatina més baixa. D'aquesta manera intentem minimitzar qualsevol toxicitat associada, emprant la menor quantitat de fàrmac, pensant també en possibles aplicacions terapèutiques. Hem pogut comprovar que quan inhibim la NOS amb l'inhibidor L-NMMA, la Nistatina no té cap efecte ni sobre els conus de creixement, ni en els fil·lopodis (**Article3.Fig5**), ni la regeneració axonal (**Article3.Fig6**). Això corrobora que la Nistatina necessita l'increment de NO sintetitzat per la NOS per poder augmentar el creixement i regeneració axonals. A més, si comparem els resultats obtinguts entre les neurones axotomitzades després de 7DIV o 14DIV, veiem que l'efecte d'inhibir la NOS és més dràstic en les neurones de 14DIV. Això suggeriria que les neurones són més dependents de l'increment del NO com més madures són (14DIV), segurament perquè les seves capacitats intrínseques per regenerar estan més limitades (**Article3.Fig6-I**) (Hilton and Bradke, 2017).

S'ha descrit que el NO activa Rac1, Cdc42 i l'ADF/cofilina (Zulauf et al., 2009), importants per la polimerització d'actina i la regeneració (Tedeschi et al., 2019), i inhibeix RhoA (Atkinson et al., 2018) que regula l'actina produint el col·lapse del conus. Això explicaria que el NO produït amb el tractament de Nistatina provoqui una reorganització del citoesquelet d'actina que promogui l'expansió del conus, la formació de fil·lopodis, el creixement i la regeneració.

Per una altra banda, cal tenir present que tant els danys que es produeixen a la membrana al extreure el colesterol, com la degradació del NO, produeixen radicals lliures ROS (de l'anglès *reactive oxygen species*). A més, la NOS, a part de sintetitzar de NO, també produeix ROS tot i que no se sap exactament el mecanisme concret (Nordzieke and Medrano-Fernandez, 2018). Per tant, quan inhibim NOS amb el L-NMMA en els nostres experiments, indirectament estem inhibint part de la generació de ROS.

S'ha descrit que els ROS regulen la dinàmica del citoesquelet d'actina en els conus de creixement, incrementant els filaments d'actina a la zona terminal i el flux retrògrad de l'actina, afavorint el creixement neurític (Munnamalai and Suter, 2009). Nivells fisiològics de ROS promouen la polimerització dels filaments d'actina a través de Rac1 i, a més a més,

igual que el NO, inhibeixen RhoA. La regulació d'ambdós enzims per ROS produeix l'expansió del conus i el creixement de les neurites (Munnamalai and Suter, 2009).

Els efectes que observem amb la Nistatina en els conus de creixement, els fil·lopodis i el creixement i ramificació axonals són molt similars als observats en els ratolins transgènics que tenen l'enzim SOD1 (de l'anglès *Cu/Zn superoxid dismutase 1*) mutat i que són model per l'estudi de l'esclerosi lateral amiotròfica (Osking et al., 2019). Aquest enzim s'encarrega de degradar els ROS, per tant la seva mutació provoca un increment d'aquests radicals lliures. No totes les motoneurons són igual de susceptibles a la mort cel·lular provocada per la mutació de l'enzim SOD1. Part d'aquestes motoneurons no arriben a desencadenar la malaltia, i s'ha vist que quan es cultiven *in vitro*, tenen conus de creixement més grans, més fil·lopodis i més llargs, les neurites creixen més i tenen més ramificacions (Osking et al., 2019). Aquests resultats són molt semblants als que nosaltres observem, cosa que ens porta a pensar que la Nistatina està incrementant els nivells de ROS ja sigui directament o indirectament per l'increment de NO.

A més, els ROS afavoreixen la regeneració axonal (Hervera et al., 2018). Després d'una lesió al nervi ciàtic, els nivells de ROS augmenten prop de la lesió i als DRG propers. Aquests ROS activen la via PI3K/Akt que desencadenarà amb l'activació dels gens RAG. D'aquesta manera es forma un ambient de lesió condicionant en el DRG, que afavoreix la regeneració dels axons que projecten tant cap al SNP com al SNC (Hervera et al., 2018). Quan inhibim NOS en els nostres experiments, no es produeix ni l'increment dels conus, ni dels fil·lopodis, ni de la regeneració axonal. Això pot ser indicatiu, o bé que els ROS són producte de l'activació de NOS per la Nistatina a 2.5 μ M, o bé que els ROS induïts per la Nistatina de forma independent a l'activitat de NOS (com per exemple per la formació de porus a la membrana) són insuficients per incrementar els conus, els fil·lopodis i la regeneració axonal. Per una altra banda, els porus produïts per la Nistatina a 10 i 25 μ M podrien estar formant nivells més elevats de ROS i aquests podrien ser els responsables de l'activació de la via PI3K/Akt (Silva et al., 2011)(Hervera et al., 2018). Per la seva banda, Akt activa Rac1 i Cdc42 (Eller-Borges et al., 2015)(Curcio and Bradke, 2018), i això comporta la reorganització del citoesquelet.

Cal tenir present però, que tant nivells elevats de NO com de ROS són tòxics per les cèl·lules i activen cascades pro-apoptòtiques que acaben portant a la mort de la neurona.

Per tant, és una qüestió d'equilibris. Un increment lleuger de NO i ROS provoca una remodelació del citoesquelet i l'activació de cascades que promouen el creixement, regeneració i supervivència cel·lular, mentre que l'increment elevat d'aquestes molècules tenen l'efecte contrari (Cossenza et al., 2014).

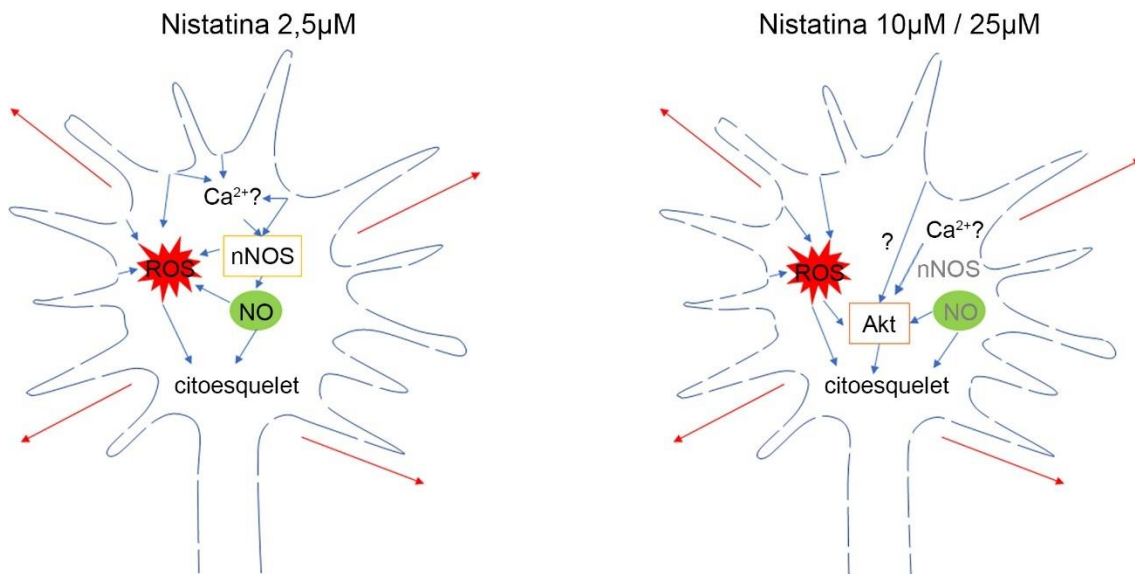


Fig19. Esquema resum del possible mecanisme d'acció de la Nistatina. A l'esquerra es mostra un conus de creixement incubat amb Nistatina 2,5µM i els possibles mecanismes que pot estar activant. La formació de porus de la membrana fa que incrementi el calci (Ca^{2+}) intracel·lular i aquest activa nNOS, de manera que incrementa la producció de NO. El NO actuarà sobre el citoesquelet d'actina incrementant els fil·lopolis i l'àrea dels conus. A més, la formació de porus i el NO produeixen un augment de ROS que també afectarà al citoesquelet. És possible que la Nistatina actuï directament sobre nNOS, independentment de l'entrada de Ca^{2+} .

A la dreta es mostra un conus de creixement incubat amb Nistatina 10 i 25µM. En aquest cas, l'entrada de Ca^{2+} incrementa la fosforilació d'Akt directament o a través del NO (via senyalitzada en gris ja que no hem demostrat la seva implicació en aquestes dosis). Tant Akt com ROS actuen sobre el citoesquelet d'actina, produint el mateix fenotip que al conus de l'esquerra. ROS pot estar activant directament la via PI3K/Akt. És possible que la Nistatina actuï directament sobre la via PI3K/Akt, independentment de l'entrada de Ca^{2+} i del NO.

Amb tots aquests resultats hem demostrat que la Nistatina incrementa la regeneració i que pot activar diferents vies, segons la dosi i el temps del tractament. Mentre que dosis baixes i curtes eleven els nivells de NO, dosis elevades i curtes activen la fosforilació d'Akt, ja sigui per efecte directe o com a conseqüència d'un possible increment del NO. Ambdues vies convergeixen en l'activació de Rac1 i Cdc42 i per tant en la regulació del citoesquelet d'actina (Eller-Borges et al., 2015)(Curcio and Bradke, 2018). També hem fet tractaments llargs amb dosis baixes on hem vist que la regeneració disminueix quan

inhibim la nNOS. Tot sembla indicar que el NO incrementa el creixement i la regeneració neural, juntament amb ROS, a través de la reorganització del citoesquelet d'actina.

La caveolina, present a *lipid rafts*, actua com a inhibidor de la nNOS bloquejant la unió d'aquest enzim al seu substrat, la L-arginina (Nordzieke and Medrano-Fernandez, 2018). Això recolza la hipòtesi que la Nistatina està afectant tant els *lipid rafts* com l'activitat de NOS, ja que al disminuir els *lipid rafts* amb dosis elevades d'aquest fàrmac, els nivells de caveolina a la membrana disminueixen o aquesta quedaria deslocalitzada i la L-arginina quedaria accessible per ser catalitzada per la nNOS (Nordzieke and Medrano-Fernandez, 2018). La M β CD actua de manera semblant a la Nistatina fent forats a la membrana i, per tant, era probable que pogués afectar els nivells de caveolina i en conseqüència afectar l'activitat de nNOS. Tal i com demostrem als nostres resultats (**Article3.FigSupl1**), podem assegurar que la M β CD no incrementa els nivells de NO. Pel que fa a altres agents farmacològics que actuen sobre els nivells de colesterol, com la ChOx, no hem fet experiments per avaluar la seva acció sobre el NO, però degut a que actua degradant el colesterol i no fent forats a la membrana, creiem que només afectaria la caveolina en reduir el colesterol de les membranes i, per tant, és possible que l'efecte sobre l'activitat de nNOS sigui menor o, fins i tot, menyspreable.

Segons el nostre punt de vista, aquests resultats no són excloents, sinó que ens aporta nova informació sobre el mecanisme d'acció de la Nistatina i ens explicaria per què és més eficient que la M β CD i la ChOx. La major eficiència de la Nistatina per incrementar la regeneració *in vitro* es podria explicar com a conseqüència de dos efectes: l'eliminació dels *lipid rafts* i l'increment dels nivells de NO. En canvi, la M β CD i la ChOx només eliminen els *lipid rafts* sense afectar els nivells de NO, i això podria explicar-nos per què no són tan eficients a l'hora d'afavorir la regeneració axonal. En el cas dels estudis *in vivo* publicats en el segon article d'aquesta tesi, només estan fets amb M β CD i, per tant, només estem avaluant la importància dels *lipid rafts* en la regeneració i no del NO. A la (**Fig. 20**) es mostra un esquema del model com els fàrmacs emprats en aquesta tesi actuarien sobre la membrana plasmàtica, iniciant vies de senyalització que culminaran en la modificació del creixement dels axons tractats.

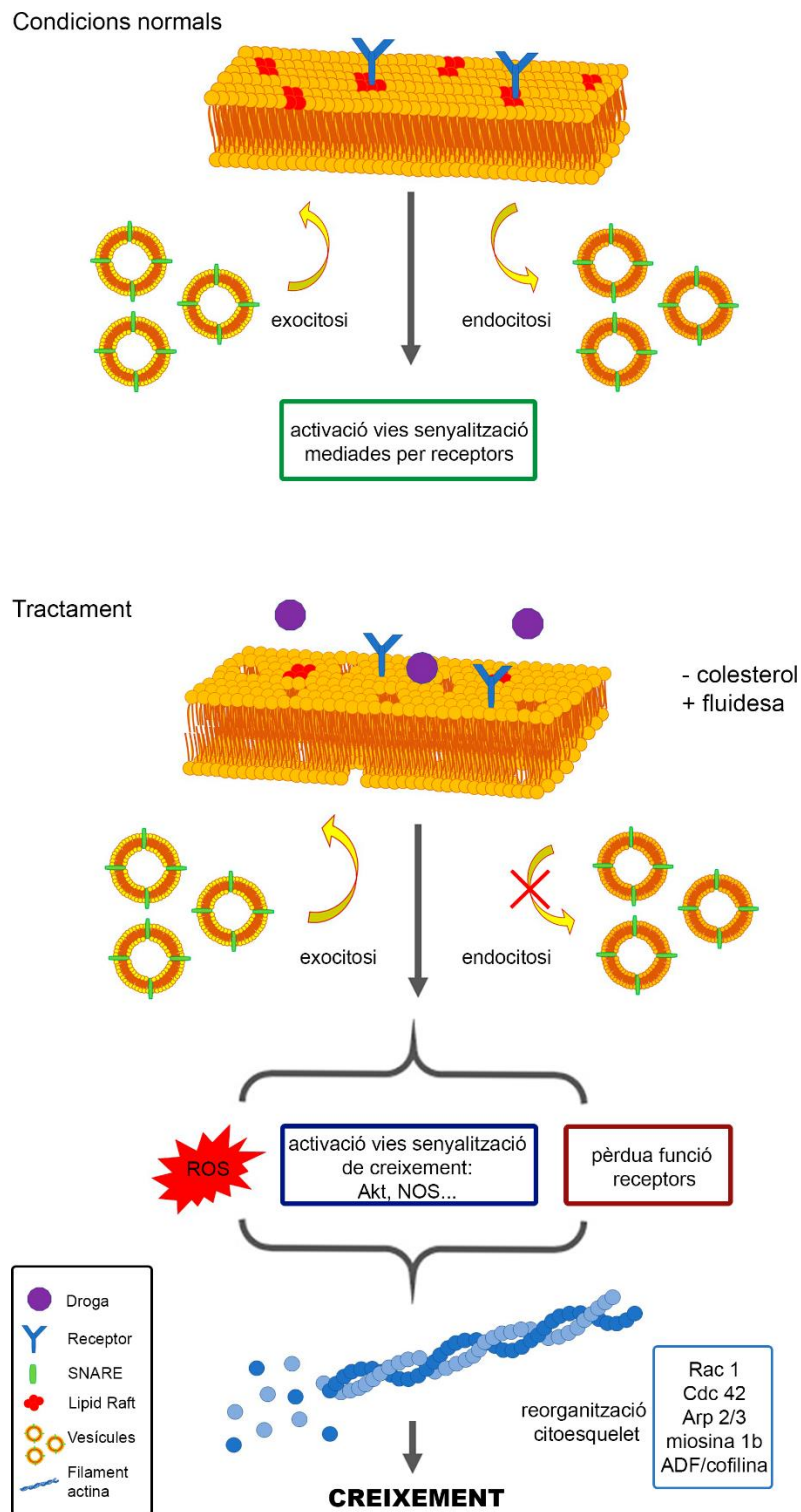
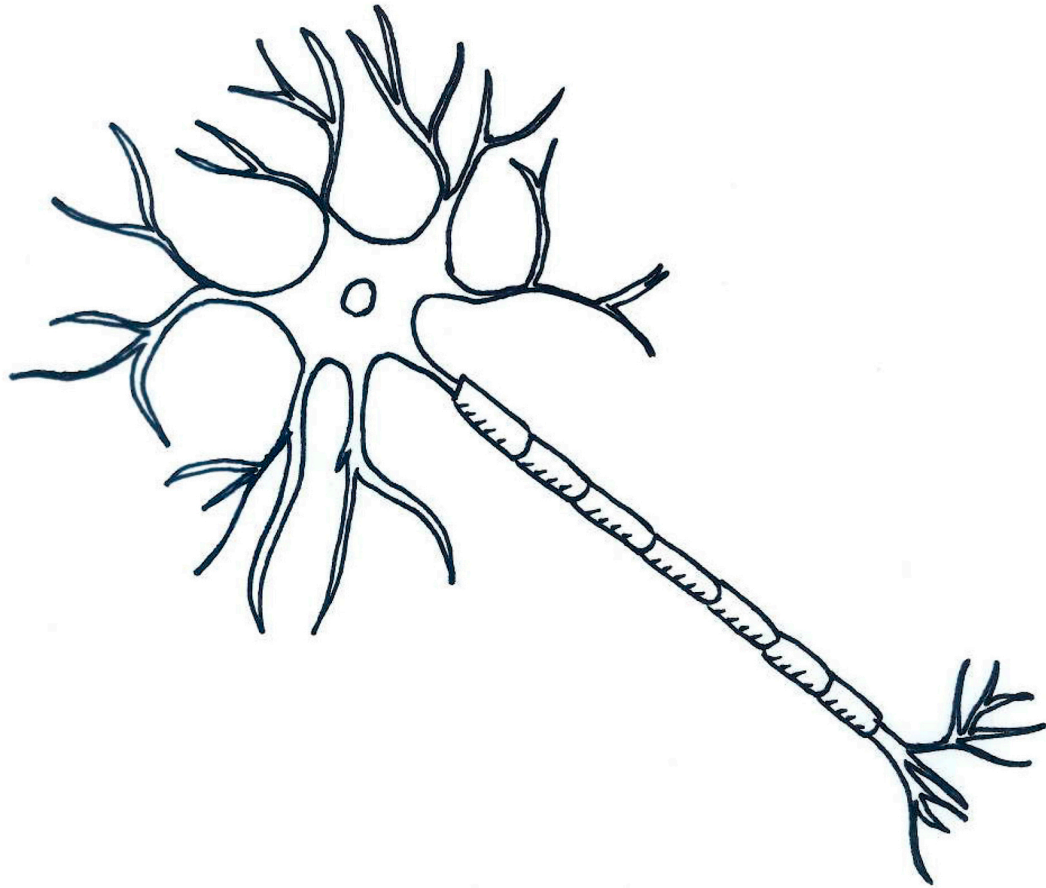


Fig20. Efectes de la membrana en el creixement. Esquema representatiu dels diferents efectes que es desencadenen quan la membrana plasmàtica es veu afectada per fàrmacs que alteren la seva composició. A dalt es veu una membrana en condicions normals, on els receptors es troben localitzats en *lipid rafts* i són funcionals i es donen processos d'exocitosi i endocitosi. A baix es representa una membrana tractada amb un fàrmac que altera els *lipid rafts*, creant-hi porus. Els receptors que es trobaven a *lipid rafts* es deslocalitzen i perden la seva funció, l'endocitosi disminueix i l'exocitosi es manté o incrementa. A més hi ha un augment de ROS i activació de vies de senyalització que promouen el creixement com Akt i nNOS. Tot junt porta a una remodelació del citoesquelet i un increment del creixement.

Fins al moment s'han provat diferents estratègies per regenerar lesions dels SNC. S'han provat teràpies infiltrant cèl·lules mare, fàrmacs i factors que promouen el creixement, com BDNF, NGF, NT-3, entre d'altres (Houlton et al., 2019)(Zibara et al., 2019)(Katoh et al., 2019). El principal impediment que es troben aquestes estratègies és travessar la barrera hematoencefàlica (en el cas del cervell) i la ràpida disseminació i eliminació pel líquid cefaloraquídi (en el cas de la medul·la espinal). Els últims avenços en recerca han permès desenvolupar biomaterials que serveixen com a suport tant per cèl·lules, com per fàrmacs i factors de creixement i permeten l'alliberació gradual i contínua a la zona d'interès (Houlton et al., 2019)(Katoh et al., 2019). D'aquesta manera es pot administrar un tractament durant períodes llargs sense haver d'injectar repetidament a la zona afectada, s'eviten danys al teixit i es pot implantar directament al lloc d'interès, sense preocupar-nos per la barrera hematoencefàlica (Tam et al., 2014)(Houlton et al., 2019)(Katoh et al., 2019).

Una opció de tractament per a traumatismes i lesions nervioses consistiria en una teràpia combinada que eliminés els *lipid rafts* i incrementés el NO. Actualment existeixen tractaments pel dolor basats en hidrogels dèrmics que incrementen la producció de NO (Pelegriño et al., 2018). Fer ús d'algun dels biomaterials provats fins ara, com els hidrogels, les microesferes o les nanofibres (Houlton et al., 2019)(Katoh et al., 2019), que alliberés de forma contínua la dosi desitjada de NO i de M β CD al lloc de la lesió, podria ser una bona estratègia per regenerar nervis lesionats. També es podria fer amb Nistatina, però la seva toxicitat en administracions sistèmiques amb la seva formulació actual, ha impedit que disposem de resultats preliminars *in vivo* que suggereixin que els resultats serien similars als obtinguts *in vitro*.



5. Conclusions

1. Les proteïnes SNARE, especialment la STX1, són necessàries per la guia axonal i el correcte desenvolupament de la línia mitja, en mosca, i de la medulla espinal en pollastre i ratolí.
2. La STX1 interactua genèticament amb les vies de senyalització de Slit/ROBO i Netrina-1/DCC en mosca, i és necessària per a la sensibilitat dels axons de les neurones comissurals de ratolí a ambdues molècules de guia axonal.
3. El receptor de Slit, ROBO 3, colocalitza amb diferents proteïnes SNARE als conus de creixement de les neurones comissurals en desenvolupament, i la manca de la STX1 afecta la seva expressió a la membrana, en presència de Netrina-1.
4. La funció de STX1 en guia axonal està conservada evolutivament en diferents espècies: mosca, pollastre i ratolí; en diferents tipus neuronals: neurones comissurals i EGL; i en diferents vies de senyalització: Slit/ROBO, Netrina-1/DCC i Netrina-1/UNC5.
5. La disminució de colesterol a les membranes provoca un increment de l'àrea dels conus de creixement i de la densitat de fil·lopodis en neurones immadures del SNC i SNP cultivades *in vitro*.
6. La disminució del colesterol a les membranes augmenta el creixement i la ramificació axonal de neurones del SNP cultivades *in vitro*.
7. La disminució del colesterol i conseqüent alteració dels microdominis *lipid rafts* incrementa la regeneració de diferents models del SNC: de neurones d'hipocamp cultivades *in vitro* i de la via perforant en cultius organotípics d'EC i hipocamp cultivats *ex vivo*.
8. Després d'una lesió del nervi ciàtic, tractaments que redueixen el colesterol a les membranes resulten en un increment dels nivells de regeneració d'aquestes neurones lesionades a nivell del SNP.
9. Incubacions amb diferents dosis de Nistatina incrementen l'àrea dels conus de creixement de neurones d'hipocamp cultivades *in vitro*.
10. La Nistatina, depenent de la dosi a la que s'utilitza, actua sobre diferents vies: mentre que a una dosi baixa (2.5 µM) activa la nNOS i incrementa la producció

d'òxid nítric, dosis altes (10 i 25 μM), que afecten els nivells de colesterol de les membranes, també incrementen la fosforilació d'Akt al conus de creixement.

11. La dosi més baixa de Nistatina (2.5 μM) incrementa el creixement i ramificació axonal de les neurones d'hipocamp *in vitro*. A més, augmenta l'àrea dels conus, la densitat de fil·lopodis i la regeneració d'aquestes neurones en un procés que requereix de l'activació de nNOS i la conseqüent formació d'òxid nítric.

Bibliografia

- Aguayo AJ, David S, Bray GM (1981) Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 95:231–240.
- Akiyama H, Fukuda T, Tojima T, Nikolaev VO, Kamiguchi H (2016) Cyclic Nucleotide Control of Microtubule Dynamics for Axon Guidance. *J Neurosci* 36:5636–5649.
- Alcantara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C (2000) Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127:1359–1372.
- Allodi I, Udina E, Navarro X (2012) Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol* 98:16–37.
- Amsalem M, Poilbout C, Ferracci G, Delmas P, Padilla F (2018) Membrane cholesterol depletion as a trigger of Nav1.9 channel-mediated inflammatory pain. *EMBO J* 37.
- Arantes RME, Andrews NW (2006) A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J Neurosci* 26:4630–4637.
- Arimura N, Kaibuchi K (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:194–205.
- Atkinson L, Yusuf MZ, Aburima A, Ahmed Y, Thomas SG, Naseem KM, Calaminus SDJ (2018) Reversal of stress fibre formation by Nitric Oxide mediated RhoA inhibition leads to reduction in the height of preformed thrombi. *Sci Rep* 8:3032.
- Averaimo S, Assali A, Ros O, Couvet S, Zagar Y, Genescu I, Rebsam A, Nicol X (2016) A plasma membrane microdomain compartmentalizes ephrin-generated cAMP signals to prune developing retinal axon arbors. *Nat Commun* 7:12896.
- Bademosi AT, Lauwers E, Padmanabhan P, Odierna L, Chai YJ, Papadopoulos A, Goodhill GJ, Verstreken P, van Swinderen B, Meunier FA (2017) In vivo single-molecule imaging of syntaxin1A reveals polyphosphoinositide- and activity-dependent trapping in presynaptic nanoclusters. *Nat Commun* 8:13660.
- Bajno L, Peng XR, Schreiber AD, Moore HP, Trimble WS, Grinstein S (2000) Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol* 149:697–706.
- Barrecheuren PJ, Ros O, Cotrufo T, Kunz B, Soriano E, Ulloa F, Stoekli ET, Araujo SJ (2017) SNARE proteins play a role in motor axon guidance in vertebrates and invertebrates. *Dev Neurobiol* 77:963–974.
- Beamish I V, Kennedy TE (2015) Robo3: the road taken. *Dev Cell* 32:3–4.
- Bennett MK, Calakos N, Scheller RH (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257:255–259.
- Berry M, Ahmed Z, Morgan-Warren P, Fulton D, Logan A (2016) Prospects for mTOR-mediated functional repair after central nervous system trauma. *Neurobiol Dis* 85:99–110.
- Bittner GD, Spaeth CS, Poon AD, Burgess ZS, McGill CH (2016) Repair of traumatic plasmalemmal damage to neurons and other eukaryotic cells. *Neural Regen Res* 11:1033–1042.
- Blanquie O, Bradke F (2018) Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 51:60–69.

Blockus H, Chédotal A (2016) Slit-Robo signaling. *Development* 143:3037 LP-3044 Available at: <http://dev.biologists.org/content/143/17/3037.abstract>.

Bloom OE, Morgan JR (2011) Membrane trafficking events underlying axon repair, growth, and regeneration. *Mol Cell Neurosci* 48:339–348.

Boyer NP, Gupton SL (2018) Revisiting Netrin-1: One Who Guides (Axons) . *Front Cell Neurosci* 12:221 Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2018.00221>.

Bradke F, Dotti CG (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283:1931–1934.

Bradke F, Fawcett JW, Spira ME (2012) Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 13:183–193.

Braun V, Fraissier V, Raposo G, Hurbain I, Sibarita J-B, Chavrier P, Galli T, Niedergang F (2004) TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J* 23:4166–4176.

Casares D, Escriba P V, Rossello CA (2019) Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci* 20.

Case LC, Tessier-Lavigne M (2005) Regeneration of the adult central nervous system. *Curr Biol* 15:R749-53.

Chédotal A (2010) Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. *Trends Neurosci* 33:163–172.

Chen L, Liu Z, Zhou B, Wei C, Zhou Y, Rosenfeld MG, Fu X-D, Chisholm AD, Jin Y (2016) CELF RNA binding proteins promote axon regeneration in *C. elegans* and mammals through alternative splicing of Syntaxins. *Elife* 5.

Cheng P-L, Song A-H, Wong Y-H, Wang S, Zhang X, Poo M-M (2011) Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18430–18435.

Chernyshova Y, Leshchyn'ska I, Hsu S-C, Schachner M, Sytnyk V (2011) The neural cell adhesion molecule promotes FGFR-dependent phosphorylation and membrane targeting of the exocyst complex to induce exocytosis in growth cones. *J Neurosci* 31:3522–3535.

Chichili GR, Rodgers W (2009) Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol Life Sci* 66:2319–2328.

Chilton JK (2006) Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 292:13–24.

Cho Y, Di Liberto V, Carlin D, Abe N, Li KH, Burlingame AL, Guan S, Michaelevski I, Cavalli V (2014) Syntaxin13 expression is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR) in injured neurons to promote axon regeneration. *J Biol Chem* 289:15820–15832.

Condeelis J, Singer RH, Segall JE (2005) The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:695–718.

Cooke RM, Mistry R, Challiss RAJ, Straub VA (2013) Nitric oxide synthesis and cGMP production is important for neurite growth and synapse remodeling after axotomy. *J Neurosci* 33:5626–5637.

- Cossenza M, Socodato R, Portugal CC, Domith ICL, Gladulich LFH, Encarnacao TG, Calaza KC, Mendonca HR, Campello-Costa P, Paes-de-Carvalho R (2014) Nitric oxide in the nervous system: biochemical, developmental, and neurobiological aspects. *Vitam Horm* 96:79–125.
- Cotrufo T, Andres RM, Ros O, Perez-Branguli F, Muhaisen A, Fuschini G, Martinez R, Pascual M, Comella JX, Soriano E (2012) Syntaxin 1 is required for DCC/Netrin-1-dependent chemoattraction of migrating neurons from the lower rhombic lip. *Eur J Neurosci* 36:3152–3164.
- Cotrufo T, Perez-Branguli F, Muhaisen A, Ros O, Andres R, Baeriswyl T, Fuschini G, Tarrago T, Pascual M, Urena J, Blasi J, Giralt E, Stoeckli ET, Soriano E (2011) A signaling mechanism coupling netrin-1/deleted in colorectal cancer chemoattraction to SNARE-mediated exocytosis in axonal growth cones. *J Neurosci* 31:14463–14480.
- Craig AM, Banker G (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17:267–310.
- Craig EM, Van Goor D, Forscher P, Mogilner A (2012) Membrane tension, myosin force, and actin turnover maintain actin treadmill in the nerve growth cone. *Biophys J* 102:1503–1513.
- Curcio M, Bradke F (2018) Axon Regeneration in the Central Nervous System: Facing the Challenges from the Inside. *Annu Rev Cell Dev Biol* 34:495–521 Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062508>.
- Decker L, French-Constant C (2004) Lipid Rafts and Integrin Activation Regulate Oligodendrocyte Survival. *J Neurosci* 24:3816 LP-3825 Available at: <http://www.jneurosci.org/content/24/15/3816.abstract>.
- del Rio JA, Soriano E (2010) Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration. *Nat Protoc* 5:217–226.
- Dominici C, Moreno-Bravo JA, Puiggros SR, Rappeneau Q, Rama N, Vieugue P, Bernet A, Mehlen P, Chedotal A (2017) Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature* 545:350–354.
- Dotti CG, Fornasiero EF, Gätner A (2015) Cadherins as regulators of neuronal polarity. Available at: <http://hdl.handle.net/10261/133287>.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454–1468.
- Dubovy P, Klusakova I, Hradilova-Svizenska I, Brazda V, Kohoutkova M, Joukal M (2019) A Conditioning Sciatic Nerve Lesion Triggers a Pro-regenerative State in Primary Sensory Neurons Also of Dorsal Root Ganglia Non-associated With the Damaged Nerve. *Front Cell Neurosci* 13:11.
- Duncan GJ, Manesh SB, Hilton BJ, Assinck P, Plemel JR, Tetzlaff W (2019) The fate and function of oligodendrocyte progenitor cells after traumatic spinal cord injury. *Glia*.
- Duraikannu A, Krishnan A, Chandrasekhar A, Zochodne DW (2019) Beyond Trophic Factors: Exploiting the Intrinsic Regenerative Properties of Adult Neurons. *Front Cell Neurosci* 13:128.
- Eller-Borges R, Batista WL, da Costa PE, Tokikawa R, Curcio MF, Strumillo ST, Sartori A, Moraes MS, de Oliveira GA, Taha MO, Fonseca F V, Stern A, Monteiro HP (2015) Ras, Rac1, and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling in nitric oxide induced endothelial cell migration. *Nitric oxide Biol Chem* 47:40–51.

Erturk A, Hellal F, Enes J, Bradke F (2007) Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *J Neurosci* 27:9169–9180.

Fawcett JW (2019) The Struggle to Make CNS Axons Regenerate: Why Has It Been so Difficult? *Neurochem Res*.

Fernández-Pérez EJ, Sepúlveda FJ, Peters C, Bascuñán D, Riffo-Lepe NO, González-Sanmiguel J, Sánchez SA, Peoples RW, Vicente B, Aguayo LG (2018) Effect of Cholesterol on Membrane Fluidity and Association of A β Oligomers and Subsequent Neuronal Damage: A Double-Edged Sword. *Front Aging Neurosci* 10:226 Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2018.00226>.

Ferrari LF, Levine JD (2015) Plasma Membrane Mechanisms in a Preclinical Rat Model of Chronic Pain. *J Pain* 16:60–66 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.10.007>.

Forbes EM, Thompson AW, Yuan J, Goodhill GJ (2012) Calcium and cAMP levels interact to determine attraction versus repulsion in axon guidance. *Neuron* 74:490–503.

Forstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33:829–37, 837a–837d.

Fujita A, Koinuma S, Yasuda S, Nagai H, Kamiguchi H, Wada N, Nakamura T (2013) GTP hydrolysis of TC10 promotes neurite outgrowth through exocytic fusion of Rab11- and L1-containing vesicles by releasing exocyst component Exo70. *PLoS One* 8:e79689.

Fujiwara T, Kofuji T, Mishima T, Akagawa K (2017) Syntaxin 1B contributes to regulation of the dopaminergic system through GABA transmission in the CNS. *Eur J Neurosci* 46:2867–2874.

Fujiwara T, Mishima T, Kofuji T, Chiba T, Tanaka K, Yamamoto A, Akagawa K (2006) Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity. *J Neurosci* 26:5767–5776.

Fujiwara T, Sanada M, Kofuji T, Akagawa K (2016) Unusual social behavior in HPC-1/syntaxin1A knockout mice is caused by disruption of the oxytocinergic neural system. *J Neurochem* 138:117–123.

Fukuda Y, Fukui T, Hikichi C, Ishikawa T, Murate K, Adachi T, Imai H, Fukuhara K, Ueda A, Kaplan AP, Mutoh T (2015) Neurotrophin promotes NGF signaling through interaction of GM1 ganglioside with Trk neurotrophin receptor in PC12 cells. *Brain Res* 1596:13–21.

Funfschilling U, Jockusch WJ, Sivakumar N, Mobius W, Corthals K, Li S, Quintes S, Kim Y, Schaap IAT, Rhee J-S, Nave K-A, Saher G (2012) Critical time window of neuronal cholesterol synthesis during neurite outgrowth. *J Neurosci* 32:7632–7645.

Fuschini G, Cotrufo T, Ros O, Muhaisen A, Andres R, Comella JX, Soriano E (2018) Syntaxin-1/TI-VAMP SNAREs interact with Trk receptors and are required for neurotrophin-dependent outgrowth. *Oncotarget* 9:35922–35940.

Galas MC, Chasserot-Golaz S, Dirrig-Grosch S, Bader MF (2000) Presence of dynamin--syntaxin complexes associated with secretory granules in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 75:1511–1519.

Gatenby RA (2019) The Role of Cell Membrane Information Reception, Processing, and Communication in the Structure and Function of Multicellular Tissue. *Int J Mol Sci* 20.

- George KS, Wu S (2012) Lipid raft: A floating island of death or survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 259:311–319.
- Giger RJ, Hollis ER 2nd, Tuszynski MH (2010) Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001867.
- Golub T, Wacha S, Caroni P (2004) Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol* 14:542–550.
- Goodrum JF, Pentchev PG (1997) Cholesterol reutilization during myelination of regenerating PNS axons is impaired in Niemann-Pick disease type C mice. *J Neurosci Res* 49:389–392.
- Gov NS, Gopinathan A (2006) Dynamics of membranes driven by actin polymerization. *Biophys J* 90:454–469.
- Grider MH, Park D, Spencer DM, Shine HD (2009) Lipid raft-targeted Akt promotes axonal branching and growth cone expansion via mTOR and Rac1, respectively. *J Neurosci Res* 87:3033–3042.
- Guirland C, Suzuki S, Kojima M, Lu B, Zheng JQ (2004) Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* 42:51–62.
- Guirland C, Zheng JQ (2007) Membrane lipid rafts and their role in axon guidance. *Adv Exp Med Biol* 621:144–155.
- Han Y-E, Lim A, Park S-H, Chang S, Lee S-H, Ho W-K (2015) Rac-mediated actin remodeling and myosin II are involved in KATP channel trafficking in pancreatic β -cells. *Exp & Mol Med* 47:e190 Available at: <https://doi.org/10.1038/emm.2015.72>.
- Han J, Pluhackova K, Bockmann RA (2017) The Multifaceted Role of SNARE Proteins in Membrane Fusion. *Front Physiol* 8:5.
- Hansen CG, Nichols BJ (2009) Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci* 122:1713–1721.
- Harder T, Simons K (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9:534–542.
- Hausott B, Rietzler A, Vallant N, Auer M, Haller I, Perkhofer S, Klimaschewski L (2011) Inhibition of fibroblast growth factor receptor 1 endocytosis promotes axonal branching of adult sensory neurons. *Neuroscience* 188:13–22.
- He Z, Jin Y (2016) Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron* 90:437–451.
- Head BP, Patel HH, Insel PA (2014) Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 1838:532–545.
- Hemmings BA, Restuccia DF (2012) PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a011189.
- Hendricks BK, Shi R (2014) Mechanisms of neuronal membrane sealing following mechanical trauma. *Neurosci Bull* 30:627–644.

Henle SJ, Wang G, Liang E, Wu M, Poo M-M, Henley JR (2011) Asymmetric PI(3,4,5)P3 and Akt signaling mediates chemotaxis of axonal growth cones. *J Neurosci* 31:7016–7027.

Hervera A, De Virgiliis F, Palmisano I, Zhou L, Tantardini E, Kong G, Hutson T, Danzi MC, Perry RB-T, Santos CXC, Kapustin AN, Fleck RA, Del Rio JA, Carroll T, Lemmon V, Bixby JL, Shah AM, Fainzilber M, Di Giovanni S (2018) Reactive oxygen species regulate axonal regeneration through the release of exosomal NADPH oxidase 2 complexes into injured axons. *Nat Cell Biol* 20:307–319.

Hinze C, Boucrot E (2018) Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells. *J Cell Sci* 131.

Hong W, Lev S (2014) Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol* 24:35–43.

Houlton J, Abumaria N, Hinkley SFR, Clarkson AN (2019) Therapeutic Potential of Neurotrophins for Repair After Brain Injury: A Helping Hand From Biomaterials. *Front Neurosci* 13:790.

Huang H, Liu H, Yan R, Hu M (2017) PI3K/Akt and ERK/MAPK Signaling Promote Different Aspects of Neuron Survival and Axonal Regrowth Following Rat Facial Nerve Axotomy. *Neurochem Res* 42:3515–3524.

Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Imran A, Qasim M, Zafar S, Kamran SKS, Razzaq A, Aziz N, Ahmad W, Shabbir A, Iqbal J, Baig SM, Sun T (2019) Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis* 18:26.

Ingolfsson HI, Carpenter TS, Bhatia H, Bremer P-T, Marrink SJ, Lightstone FC (2017) Computational Lipidomics of the Neuronal Plasma Membrane. *Biophys J* 113:2271–2280.

Jaworski A, Tom I, Tong RK, Gildea HK, Koch AW, Gonzalez LC, Tessier-Lavigne M (2015) Operational redundancy in axon guidance through the multifunctional receptor Robo3 and its ligand NELL2. *Science* 350:961–965.

Jessen KR, Mirsky R (2016) The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol* 594:3521–3531.

Jin E-J, Ko HR, Hwang I, Kim B-S, Choi J-Y, Park KW, Cho S-W, Ahn J-Y (2018) Akt regulates neurite growth by phosphorylation-dependent inhibition of radixin proteasomal degradation. *Sci Rep* 8:2557 Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20755-w>.

Kaech S, Banker G (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1:2406–2415.

Kaiser H-J, Lingwood D, Levental I, Sampaio JL, Kalvodova L, Rajendran L, Simons K (2009) Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16645–16650.

Kakumoto T, Nakata T (2013) Optogenetic control of PIP3: PIP3 is sufficient to induce the actin-based active part of growth cones and is regulated via endocytosis. *PLoS One* 8:e70861.

Kalappurakkal JM, Anilkumar AA, Patra C, van Zanten TS, Sheetz MP, Mayor S (2019) Integrin Mechano-chemical Signaling Generates Plasma Membrane Nanodomains that Promote Cell Spreading. *Cell* 177:1738–1756.e23.

Kamiguchi H (2006) The region-specific activities of lipid rafts during axon growth and guidance. *J Neurochem* 98:330–335.

Kang S-J, Kim JS, Park SM (2018) Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1 Regulates Lipid Raft-dependent Endocytosis. *Exp Neurobiol* 27:377–386.

- Kao H-T, Ryoo K, Lin A, Janoschka SR, Augustine GJ, Porton B (2017) Synapsins regulate brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic potentiation and axon elongation by acting on membrane rafts. *Eur J Neurosci* 45:1085–1101.
- Karmakar S, Sharma LG, Roy A, Patel A, Pandey LM (2019) Neuronal SNARE complex: A protein folding system with intricate protein-protein interactions, and its common neuropathological hallmark, SNAP25. *Neurochem Int* 122:196–207.
- Katoh H, Yokota K, Fehlings MG (2019) Regeneration of Spinal Cord Connectivity Through Stem Cell Transplantation and Biomaterial Scaffolds. *Front Cell Neurosci* 13:248.
- Ketschek A, Gallo G (2010) Nerve growth factor induces axonal filopodia through localized microdomains of phosphoinositide 3-kinase activity that drive the formation of cytoskeletal precursors to filopodia. *J Neurosci* 30:12185–12197.
- Kikuchi R, Ambe K, Kon H, Takada S, Watanabe H (2018) Nitric Oxide Synthase (NOS) Isoform Expression after Peripheral Nerve Transection in Mice. *Bull Tokyo Dent Coll* 59:15–25.
- Kim D-H, Rhim B-Y, Eo S-K, Kim K (2013) Differential regulation of CC chemokine ligand 2 and CXCL8 by antifungal agent nystatin in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 437:392–396.
- Kim N, Chen D, Zhou XZ, Lee TH (2019) Death-Associated Protein Kinase 1 Phosphorylation in Neuronal Cell Death and Neurodegenerative Disease. *Int J Mol Sci* 20.
- Kloepper TH, Kienle CN, Fasshauer D (2007) An elaborate classification of SNARE proteins sheds light on the conservation of the eukaryotic endomembrane system. *Mol Biol Cell* 18:3463–3471.
- Ko M, Zou K, Minagawa H, Yu W, Gong J-S, Yanagisawa K, Michikawa M (2005) Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J Biol Chem* 280:42759–42765.
- Kofuji T, Fujiwara T, Sanada M, Mishima T, Akagawa K (2014) HPC-1/syntaxin 1A and syntaxin 1B play distinct roles in neuronal survival. *J Neurochem* 130:514–525.
- Kofuji T, Hayashi Y, Fujiwara T, Sanada M, Tamaru M, Akagawa K (2017) A part of patients with autism spectrum disorder has haploidy of HPC-1/syntaxin1A gene that possibly causes behavioral disturbance as in experimentally gene ablated mice. *Neurosci Lett* 644:5–9.
- Koide N, Naiki Y, Morikawa A, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Noman ASM, Iftekar-E-Khuda I, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T (2009) Nystatin-induced nitric oxide production in mouse macrophage-like cell line RAW264.7. *Microbiol Immunol* 53:295–300.
- Kolodkin AL, Tessier-Lavigne M (2011) Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Kolpak AL, Jiang J, Guo D, Standley C, Bellve K, Fogarty K, Bao Z-Z (2009) Negative guidance factor-induced macropinocytosis in the growth cone plays a critical role in repulsive axon turning. *J Neurosci* 29:10488–10498.
- Komura N, Suzuki KGN, Ando H, Konishi M, Koikeda M, Imamura A, Chadda R, Fujiwara TK, Tsuboi H, Sheng R, Cho W, Furukawa K, Furukawa K, Yamauchi Y, Ishida H, Kusumi A, Kiso M (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat Chem Biol* 12:402–410.

Lai Wing Sun K, Correia JP, Kennedy TE (2011) Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* 138:2153–2169.

Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Dautry-Varsat A (2001) Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* 7:661–671.

Laurino L, Wang XX, de la Houssaye BA, Sosa L, Dupraz S, Caceres A, Pfenninger KH, Quiroga S (2005) PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J Cell Sci* 118:3653–3662.

Lei W-L, Xing S-G, Deng C-Y, Ju X-C, Jiang X-Y, Luo Z-G (2012) Laminin/ β 1 integrin signal triggers axon formation by promoting microtubule assembly and stabilization. *Cell Res* 22:954–972.

Leibinger M, Hilla AM, Andreadaki A, Fischer D (2019) GSK3-CRMP2 signaling mediates axonal regeneration induced by Pten knockout. *Commun Biol* 2:318 Available at: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0524-1>.

Leitinger B, Hogg N (2002) The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J Cell Sci* 115:963–972.

Levental I, Byfield FJ, Chowdhury P, Gai F, Baumgart T, Janmey PA (2009) Cholesterol-dependent phase separation in cell-derived giant plasma-membrane vesicles. *Biochem J* 424:163–167.

Lewis TL, Courchet J, Polleux F (2013) Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J Cell Biol* 202:837 LP-848 Available at: <http://jcb.rupress.org/content/202/6/837.abstract>.

Li H-P, Komuta Y, Kimura-Kuroda J, van Kuppevelt TH, Kawano H (2013) Roles of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in the formation of a lesion scar and axonal regeneration after traumatic injury of the mouse brain. *J Neurotrauma* 30:413–425.

Li L, Hu J, Shi X, Shao Y, Song F (2017a) Lipid rafts enhance the binding constant of membrane-anchored receptors and ligands. *Soft Matter* 13:4294–4304.

Li L, Song H, Mu P, Xu M, Liu C, Wang Y, Qin Y, Sun S, Gao J, Wang T, Gao D (2017b) The Actin Cytoskeleton Is Involved in Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)-Induced Ret Translocation into Lipid Rafts in Dopaminergic Neuronal Cells. *Int J Mol Sci* 18.

Li X, Li J, Xiao Z, Dai J (2018) [The role of glial scar on axonal regeneration after spinal cord injury]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 32:973–978.

Li X, Radhakrishnan A, Grushin K, Kasula R, Chaudhuri A, Gomathinayagam S, Krishnakumar SS, Liu J, Rothman JE (2019) Symmetrical organization of proteins under docked synaptic vesicles. *FEBS Lett* 593:144–153.

Lowery LA, Vactor D Van (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:332 Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2679>.

Maguy A, Hebert TE, Nattel S (2006) Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovasc Res* 69:798–807.

Manning BD, Toker A (2017) AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169:381–405.

- Martinez-Arca S, Alberts P, Zahraoui A, Louvard D, Galli T (2000) Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J Cell Biol* 149:889–900.
- Marzban H, Del Bigio MR, Alizadeh J, Ghavami S, Zachariah RM, Rastegar M (2014) Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front Cell Neurosci* 8:450.
- Mattei V, Santacroce C, Tasciotti V, Martellucci S, Santilli F, Manganelli V, Piccoli L, Misasi R, Sorice M, Garofalo T (2015) Role of lipid rafts in neuronal differentiation of dental pulp-derived stem cells. *Exp Cell Res* 339:231–240.
- Mejia-Garcia TA, Portugal CC, Encarnacao TG, Prado MAM, Paes-de-Carvalho R (2013) Nitric oxide regulates AKT phosphorylation and nuclear translocation in cultured retinal cells. *Cell Signal* 25:2424–2439.
- Meldolesi J (2011) Neurite outgrowth: this process, first discovered by Santiago Ramon y Cajal, is sustained by the exocytosis of two distinct types of vesicles. *Brain Res Rev* 66:246–255.
- Miller KE, Suter DM (2018) An Integrated Cytoskeletal Model of Neurite Outgrowth. *Front Cell Neurosci* 12:447.
- Mishima T, Fujiwara T, Sanada M, Kofuji T, Kanai-Azuma M, Akagawa K (2014) Syntaxin 1B, but not syntaxin 1A, is necessary for the regulation of synaptic vesicle exocytosis and of the readily releasable pool at central synapses. *PLoS One* 9:e90004.
- Miyamoto Y, Yamauchi J, Tanoue A, Wu C, Mobley WC (2006) TrkB binds and tyrosine-phosphorylates Tiam1, leading to activation of Rac1 and induction of changes in cellular morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10444–10449.
- Moore SW, Tessier-Lavigne M, Kennedy TE (2007) Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 621:17–31.
- Munnamalai V, Suter DM (2009) Reactive oxygen species regulate F-actin dynamics in neuronal growth cones and neurite outgrowth. *J Neurochem* 108:644–661.
- Nakamuta S, Funahashi Y, Namba T, Arimura N, Picciotto MR, Tokumitsu H, Soderling TR, Sakakibara A, Miyata T, Kamiguchi H, Kaibuchi K (2011) Local application of neurotrophins specifies axons through inositol 1,4,5-trisphosphate, calcium, and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Sci Signal* 4:ra76.
- Namba T, Funahashi Y, Nakamuta S, Xu C, Takano T, Kaibuchi K (2015) Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity. *Physiol Rev* 95:995–1024.
- Narayana VK, Tomatis VM, Wang T, Kvaskoff D, Meunier FA (2015) Profiling of Free Fatty Acids Using Stable Isotope Tagging Uncovers a Role for Saturated Fatty Acids in Neuroexocytosis. *Chem Biol* 22:1552–1561.
- Neuhaus-Follini A, Bashaw GJ (2015) Crossing the embryonic midline: molecular mechanisms regulating axon responsiveness at an intermediate target. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4:377–389.
- Nichols EL, Smith CJ (2019) Synaptic-like Vesicles Facilitate Pioneer Axon Invasion. *Curr Biol* 29:2652–2664.e4.

Nordzieke DE, Medrano-Fernandez I (2018) The Plasma Membrane: A Platform for Intra- and Intercellular Redox Signaling. *Antioxidants* (Basel, Switzerland) 7.

Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackelford G, McMahon A, Moon R, Varmus H (1991) A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* 64:231.

Ohtsuka H, Iguchi T, Hayashi M, Kaneda M, Iida K, Shimonaka M, Hara T, Arai M, Koike Y, Yamamoto N, Kasahara K (2017) SDF-1alpha/CXCR4 Signaling in Lipid Rafts Induces Platelet Aggregation via PI3 Kinase-Dependent Akt Phosphorylation. *PLoS One* 12:e0169609.

Olsen ASB, Faergeman NJ (2017) Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biol* 7.

Omotade OF, Pollitt SL, Zheng JQ (2017) Actin-based growth cone motility and guidance. *Mol Cell Neurosci* 84:4–10.

Osen-Sand A, Catsicas M, Staple JK, Jones KA, Ayala G, Knowles J, Grenningloh G, Catsicas S (1993) Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Nature* 364:445–448.

Osking Z, Ayers JI, Hildebrandt R, Skrubber K, Brown H, Ryu D, Eukovich AR, Golde TE, Borchelt DR, Read T-A, Vitriol EA (2019) ALS-Linked SOD1 Mutants Enhance Neurite Outgrowth and Branching in Adult Motor Neurons. *iScience* 11:294–304.

Papandreou M-J, Leterrier C (2018) The functional architecture of axonal actin. *Mol Cell Neurosci* 91:151–159.

Paratcha G, Ledda F, Baars L, Couplier M, Besset V, Anders J, Scott R, Ibanez CF (2001) Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron* 29:171–184.

Pelegrino MT, De Araujo Lima B, Do Nascimento MHM, Lombello CB, Brocchi M, Seabra AB (2018) Biocompatible and Antibacterial Nitric Oxide-Releasing Pluronic F-127/Chitosan Hydrogel for Topical Applications. *Polymers* (Basel) 10.

Petkovic M, Jemaiel A, Daste F, Specht CG, Izeddin I, Vorkel D, Verbavatz J-M, Darzacq X, Triller A, Pfenninger KH, Tareste D, Jackson CL, Galli T (2014) The SNARE Sec22b has a non-fusogenic function in plasma membrane expansion. *Nat Cell Biol* 16:434–444.

Petrozziello T, Secondo A, Tedeschi V, Esposito A, Sisalli M, Scorziello A, Di Renzo G, Annunziato L (2017) ApoSOD1 lacking dismutase activity neuroprotects motor neurons exposed to beta-methylamino-L-alanine through the Ca(2+)/Akt/ERK1/2 prosurvival pathway. *Cell Death Differ* 24:511–522.

Pfenninger KH (2009) Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat Rev Neurosci* 10:251–261.

Pryor S, McCaffrey G, Young LR, Grimes ML (2012) NGF causes TrkA to specifically attract microtubules to lipid rafts. *PLoS One* 7:e35163.

Redondo J, Hares K, Wilkins A, Scolding N, Kemp K (2015) Reductions in kinesin expression are associated with nitric oxide-induced axonal damage. *J Neurosci Res* 93:882–892.

Rizo J (2018) Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. *Protein Sci* 27:1364–1391.

- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10:961–974.
- Rodemer W, Selzer ME (2019) Role of axon resealing in retrograde neuronal death and regeneration after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 14:399–404.
- Ros O, Barrecheguren PJ, Cotrufo T, Schaettin M, Roselló-Busquets C, Vílchez-Acosta A, Hernaiz-Llorens M, Martínez-Marmol R, Ulloa F, Stoeckli ET, Araújo SJ, Soriano E (2018) A conserved role for Syntaxin-1 in pre- and post-commissural midline axonal guidance in fly, chick, and mouse. Moens C, ed. *PLOS Genet* 14:e1007432 Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1007432>.
- Ros O, Cotrufo T, Martinez-Marmol R, Soriano E (2015) Regulation of patterned dynamics of local exocytosis in growth cones by netrin-1. *J Neurosci* 35:5156–5170.
- Rosello-Busquets C, de la Oliva N, Martinez-Marmol R, Hernaiz-Llorens M, Pascual M, Muhaisen A, Navarro X, Del Valle J, Soriano E (2019) Cholesterol Depletion Regulates Axonal Growth and Enhances Central and Peripheral Nerve Regeneration. *Front Cell Neurosci* 13:40.
- Rothman JE, Krishnakumar SS, Grushin K, Pincet F (2017) Hypothesis - buttressed rings assemble, clamp, and release SNAREpins for synaptic transmission. *FEBS Lett* 591:3459–3480.
- Sabo SL, McAllister AK (2003) Mobility and cycling of synaptic protein-containing vesicles in axonal growth cone filopodia. *Nat Neurosci* 6:1264–1269.
- Saghy E, Szoke E, Payrits M, Helyes Z, Borzsei R, Erostyak J, Janosi TZ, Setalo GJ, Szolcsanyi J (2015) Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca²⁺-gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Pharmacol Res* 100:101–116.
- Salaun C, James DJ, Chamberlain LH (2004) Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic* 5:255–264.
- Santuccion A, Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Schachner M (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{fyn} and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169:341–354.
- Schelski M, Bradke F (2017) Neuronal polarization: From spatiotemporal signaling to cytoskeletal dynamics. *Mol Cell Neurosci* 84:11–28.
- Schwamborn JC, Püschel AW (2004) The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* 7:923–929 Available at: <https://doi.org/10.1038/nn1295>.
- Senger J-LB, Verge VMK, Chan KM, Webber CA (2018) The nerve conditioning lesion: A strategy to enhance nerve regeneration. *Ann Neurol* 83:691–702.
- Seong J, Huang M, Sim KM, Kim H, Wang Y (2017) FRET-based Visualization of PDGF Receptor Activation at Membrane Microdomains. *Sci Rep* 7:1593.
- Sezgin E, Gutmann T, Buhl T, Dirx R, Grzybek M, Coskun U, Solimena M, Simons K, Levental I, Schwille P (2015) Adaptive lipid packing and bioactivity in membrane domains. *PLoS One* 10:e0123930.

- Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C (2017) The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:361–374.
- Sezgin E, Sadowski T, Simons K (2014) Measuring lipid packing of model and cellular membranes with environment sensitive probes. *Langmuir* 30:8160–8166.
- Sezgin E, Schwille P (2011) Fluorescence techniques to study lipid dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a009803.
- Sezgin E, Schwille P (2012) Model membrane platforms to study protein-membrane interactions. *Mol Membr Biol* 29:144–154.
- Shelly M, Cancedda L, Heilshorn S, Sumbre G, Poo M-M (2007) LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129:565–577.
- Shelly M, Cancedda L, Lim BK, Popescu AT, Cheng P, Gao H, Poo M (2011) Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth. *Neuron* 71:433–446.
- Shibata K, Sakai H, Huang Q, Kamata H, Chiba Y, Misawa M, Ikebe R, Ikebe M (2015) Rac1 regulates myosin II phosphorylation through regulation of myosin light chain phosphatase. *J Cell Physiol* 230:1352–1364.
- Sild M, Van Horn MR, Schohl A, Jia D, Ruthazer ES (2016) Neural Activity-Dependent Regulation of Radial Glial Filopodial Motility Is Mediated by Glial cGMP-Dependent Protein Kinase 1 and Contributes to Synapse Maturation in the Developing Visual System. *J Neurosci* 36:5279–5288.
- Silva A, Girio A, Cebola I, Santos CI, Antunes F, Barata JT (2011) Intracellular reactive oxygen species are essential for PI3K/Akt/mTOR-dependent IL-7-mediated viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 25:960–967.
- Simons K, Gerl MJ (2010) Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:688–699.
- Simons K, Sampaio JL (2011) Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004697.
- Soares ES, Mendonca MCP, Irazusta SP, Coope A, Stavale LM, da Cruz-Hofling MA (2014) Evidences of endocytosis via caveolae following blood-brain barrier breakdown by Phoneutria nigriventer spider venom. *Toxicol Lett* 229:415–422.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75:409–418.
- Stoeckli ET (2018) Understanding axon guidance: are we nearly there yet? *Development* 145:dev151415 Available at: <http://dev.biologists.org/content/145/10/dev151415.abstract>.
- Su Y, Kondrikov D, Block ER (2005) Cytoskeletal regulation of nitric oxide synthase. *Cell Biochem Biophys* 43:439–449.
- Sural-Fehr T, Singh H, Cantuti-Catelvetri L, Zhu H, Marshall MS, Rebiai R, Jastrzebski MJ, Givogri MI, Rasenick MM, Bongarzone ER (2019) Inhibition of the IGF-1-PI3K-Akt-mTORC2 pathway in lipid rafts increases neuronal vulnerability in a genetic lysosomal glycosphingolipidosis. *Dis Model Mech* 12.

- Suzuki KGN (2016) Single-Molecule Imaging of Signal Transduction via GPI-Anchored Receptors. *Methods Mol Biol* 1376:229–238.
- Takano T, Funahashi Y, Kaibuchi K (2019) Neuronal Polarity: Positive and Negative Feedback Signals. *Front Cell Dev Biol* 7:69 Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2019.00069>.
- Takano T, Wu M, Nakamuta S, Naoki H, Ishizawa N, Namba T, Watanabe T, Xu C, Hamaguchi T, Yura Y, Amano M, Hahn KM, Kaibuchi K (2017) Discovery of long-range inhibitory signaling to ensure single axon formation. *Nat Commun* 8:33.
- Takano T, Xu C, Funahashi Y, Namba T, Kaibuchi K (2015) Neuronal polarization. *Development* 142:2088 LP-2093 Available at: <http://dev.biologists.org/content/142/12/2088.abstract>.
- Tam RY, Fuehrmann T, Mitrousis N, Shoichet MS (2014) Regenerative therapies for central nervous system diseases: a biomaterials approach. *Neuropsychopharmacology* 39:169–188.
- Tan AM, Zhang W, Levine JM (2005) NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. *J Anat* 207:717–725.
- Tang BL (2018) Promoting axonal regeneration through exosomes: An update of recent findings on exosomal PTEN and mTOR modifiers. *Brain Res Bull* 143:123–131.
- Tassew NG, Mothe AJ, Shabanzadeh AP, Banerjee P, Koeberle PD, Bremner R, Tator CH, Monnier PP (2014) Modifying lipid rafts promotes regeneration and functional recovery. *Cell Rep* 8:1146–1159.
- Tedeschi A, Dupraz S, Curcio M, Laskowski CJ, Schaffran B, Flynn KC, Santos TE, Stern S, Hilton BJ, Larson MJE, Gurniak CB, Witke W, Bradke F (2019) ADF/Cofilin-Mediated Actin Turnover Promotes Axon Regeneration in the Adult CNS. *Neuron*.
- Teng FY, Wang Y, Tang BL (2001) The syntaxins. *Genome Biol* 2:REVIEWS3012.
- Thippeswamy T, Morris R (2002) The roles of nitric oxide in dorsal root ganglion neurons. *Ann N Y Acad Sci* 962:103–110.
- Tojima T, Akiyama H, Itofusa R, Li Y, Katayama H, Miyawaki A, Kamiguchi H (2007) Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat Neurosci* 10:58–66.
- Tojima T, Itofusa R, Kamiguchi H (2009) The nitric oxide-cGMP pathway controls the directional polarity of growth cone guidance via modulating cytosolic Ca²⁺ signals. *J Neurosci* 29:7886–7897.
- Tojima T, Kamiguchi H (2015) Exocytic and endocytic membrane trafficking in axon development. *Dev Growth Differ* 57:291–304.
- Tong M, Jun T, Nie Y, Hao J, Fan D (2019) The Role of the Slit/Robo Signaling Pathway. *J Cancer* 10:2694–2705.
- Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EMJ (2002) Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci* 25:412–417.
- Tuck E, Cavalli V (2010) Roles of membrane trafficking in nerve repair and regeneration. *Commun Integr Biol* 3:209–214.

Van Wagenen S, Rehder V (2001) Regulation of neuronal growth cone filopodia by nitric oxide depends on soluble guanylyl cyclase. *J Neurobiol* 46:206–219.

Varadarajan SG, Kong JH, Phan KD, Kao T-J, Panaitof SC, Cardin J, Eltzhig H, Kania A, Novitsch BG, Butler SJ (2017) Netrin1 Produced by Neural Progenitors, Not Floor Plate Cells, Is Required for Axon Guidance in the Spinal Cord. *Neuron* 94:790–799.e3.

Vardar G, Chang S, Arancillo M, Wu Y-J, Trimbuch T, Rosenmund C (2016) Distinct Functions of Syntaxin-1 in Neuronal Maintenance, Synaptic Vesicle Docking, and Fusion in Mouse Neurons. *J Neurosci* 36:7911–7924.

Vargas ME, Barres BA (2007) Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci* 30:153–179.

Vinson M, Rausch O, Maycox PR, Prinjha RK, Chapman D, Morrow R, Harper AJ, Dingwall C, Walsh FS, Burbidge SA, Riddell DR (2003) Lipid rafts mediate the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons. *Mol Cell Neurosci* 22:344–352.

Vitriol EA, Zheng JQ (2012) Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron* 73:1068–1081.

Wang S, Li Y, Gong J, Ye S, Yang X, Zhang R, Ma C (2019) Munc18 and Munc13 serve as a functional template to orchestrate neuronal SNARE complex assembly. *Nat Commun* 10:69.

Wang T, Li L, Hong W (2017) SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic* 18:767–775.

Watanabe K, Al-Bassam S, Miyazaki Y, Wandless TJ, Webster P, Arnold DB (2012) Networks of polarized actin filaments in the axon initial segment provide a mechanism for sorting axonal and dendritic proteins. *Cell Rep* 2:1546–1553.

Wei B, Chen Z, Zhang X, Feldman M, Dong X, Doran R, Zhao B-L, Yin W, Kotlikoff MI, Ji G (2008) Nitric Oxide Mediates Stretch-Induced Ca²⁺ Release via Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway in Smooth Muscle. *PLoS One* 3:e2526 Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002526>.

Welshhans K, Rehder V (2005) Local activation of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in growth cones regulates filopodial length via protein kinase G, cyclic ADP ribose and intracellular Ca²⁺ release. *Eur J Neurosci* 22:3006–3016.

Whitten AE, Jarrott RJ, Hu S-H, Duff AP, King GJ, Martin JL, Christie MP (2019) Studying Munc18:Syntaxin Interactions Using Small-Angle Scattering. *Methods Mol Biol* 1860:115–144.

Wickert M, Hildick KL, Baillie GL, Jelinek R, Aparisi Rey A, Monory K, Schneider M, Ross RA, Henley JM, Lutz B (2018) The F238L Point Mutation in the Cannabinoid Type 1 Receptor Enhances Basal Endocytosis via Lipid Rafts. *Front Mol Neurosci* 11:230.

Witte H, Neukirchen D, Bradke F (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180:619 LP-632 Available at: <http://jcb.rupress.org/content/180/3/619.abstract>.

Wu Y-J, Tejero R, Arancillo M, Vardar G, Korotkova T, Kintscher M, Schmitz D, Ponomarenko A, Tabares L, Rosenmund C (2015) Syntaxin 1B is important for mouse postnatal survival and proper synaptic function at the mouse neuromuscular junctions. *J Neurophysiol* 114:2404–2417.

Wu Z, Makihara S, Yam PT, Teo S, Renier N, Balekoglu N, Moreno-Bravo JA, Olsen O, Chedotal A, Charron F, Tessier-Lavigne M (2019) Long-Range Guidance of Spinal Commissural Axons by Netrin1 and Sonic Hedgehog from Midline Floor Plate Cells. *Neuron* 101:635–647.e4.

Yamamoto S, Iwamaru Y, Shimizu Y, Ueda Y, Sato M, Yamaguchi K, Nakanishi J (2019) Epidermal growth factor-nanoparticle conjugates change the activity from anti-apoptotic to pro-apoptotic at membrane rafts. *Acta Biomater* 88:383–391.

Ye X, Qiu Y, Gao Y, Wan D, Zhu H (2019) A Subtle Network Mediating Axon Guidance: Intrinsic Dynamic Structure of Growth Cone, Attractive and Repulsive Molecular Cues, and the Intermediate Role of Signaling Pathways. *Neural Plast* 2019:1719829.

Ypsilanti AR, Zagar Y, Chédotal A (2010) Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* 137:1939 LP-1952 Available at: <http://dev.biologists.org/content/137/12/1939.abstract>.

Yuan W, Zhou L, Chen JH, Wu JY, Rao Y, Ornitz DM (1999) The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol* 212:290–306.

Yuan X, Jin M, Xu X, Song Y, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol* 5:38–45.

Yudushkin I (2019) Getting the Akt Together: Guiding Intracellular Akt Activity by PI3K. *Biomolecules* 9.

Zaidi A, Adewale M, McLean L, Ramlow P (2018) The plasma membrane calcium pumps-The old and the new. *Neurosci Lett* 663:12–17.

Zelina P, Blockus H, Zagar Y, Peres A, Friocourt F, Wu Z, Rama N, Fouquet C, Hohenester E, Tessier-Lavigne M, Schweitzer J, Roest Crollius H, Chedotal A (2014) Signaling switch of the axon guidance receptor Robo3 during vertebrate evolution. *Neuron* 84:1258–1272.

Zhang Y, Chopp M, Liu XS, Katakowski M, Wang X, Tian X, Wu D, Zhang ZG (2017) Exosomes Derived from Mesenchymal Stromal Cells Promote Axonal Growth of Cortical Neurons. *Mol Neurobiol* 54:2659–2673.

Zhang YH, Khanna R, Nicol GD (2013) Nerve growth factor/p75 neurotrophin receptor-mediated sensitization of rat sensory neurons depends on membrane cholesterol. *Neuroscience* 248:562–570.

Zhao B, Meka DP, Scharrenberg R, König T, Schwanke B, Kobler O, Windhorst S, Kreutz MR, Mikhaylova M, Calderon de Anda F (2017) Microtubules Modulate F-actin Dynamics during Neuronal Polarization. *Sci Rep* 7:9583 Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09832-8>.

Zhou L, Zhu D-Y (2009) Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide Biol Chem* 20:223–230.

Zibara K, Ballout N, Mondello S, Karnib N, Ramadan N, Omais S, Nabbouh A, Caliz D, Clavijo A, Hu Z, Ghanem N, Gajavelli S, Kobeissy F (2019) Combination of drug and stem cells neurotherapy: Potential interventions in neurotrauma and traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 145:177–198.

Zulauf L, Coste O, Marian C, Moser C, Brenneis C, Niederberger E (2009) Cofilin phosphorylation is involved in nitric oxide/cGMP-mediated nociception. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1408–1413.

Zylbersztejn K, Petkovic M, Burgo A, Deck M, Garel S, Marcos S, Bloch-Gallego E, Nothias F, Serini G, Bagnard D, Binz T, Galli T (2012) The vesicular SNARE Synaptobrevin is required for Semaphorin 3A axonal repulsion. *J Cell Biol* 196:37–46.