

Anàlisi de les funcions de la proteïna NCAM2 en desenvolupament i plasticitat neuronal

Alba Ortega Gascó

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.

Anàlisi de les funcions de la proteïna NCAM2 en el desenvolupament i la plasticitat neuronal

ALBA ORTEGA GASCÓ Barcelona, 2023





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

PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA

Anàlisi de les funcions de la proteïna NCAM2 en el desenvolupament i la plasticitat neuronal

Programa de Doctorat en Biomedicina

Memòria presentada per Alba Ortega Gascó, graduada en Ciències Biomèdiques, per a optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona.

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

Barcelona, maig de 2023.

Vist i plau dels directors i tutor de la tesis:

maus.

Dr. Eduardo Soriano García (Director i tutor)

Dr. Lluís Pujadas Puigdomènech (Director)

Doctoranda Alba Ortega Gascó

A la meva germana, als meus pares i als meus avis

Agraïments

Aquestes pàgines tanquen una de les etapes més importants de la meva vida. Al llarg d'aquests anys he tingut l'oportunitat de dedicar-me a un món que m'entusiasma. El camí no ha estat fàcil, però gràcies a ell he crescut personalment, m'he format com a científica i he viscut experiències inoblidables. Així que moltes gràcies a tots els que heu format part d'aquesta fantàstica aventura.

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies al Dr. Eduardo Soriano per acollirme al laboratori i donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi, d'aprendre i de formar-me com a científica. Al Dr. Lluís Pujadas, gràcies per confiar en mi i orientar-me al llarg d'aquests anys. A tots dos, gràcies per obrir-me les portes a l'apassionant món de la investigació.

A tots els membres del laboratori i el departament amb els quals he coincidit al llarg d'aquests anys, gràcies per ser-hi des dels inicis. Vaig començar en el laboratori fa més de vuit anys i al vostre costat he après i gaudit molt. Aquesta tesi ha estat possible també gràcies al vostre recolzament i consell. Al Toni, gràcies per compartir amb mi el projecte de NCAM2. Tot i que els inicis van ser complicats, i tots sabem que NCAM2 no era la meva primera opció, he après a estimar-la i gràcies a ella he après moltíssim. La teva ajuda, suport i consell al llarg d'aquests anys han contribuït a fer possible aquesta tesi. Gràcies també per ser un company de manis, pels consells no científics o els debats futbolístics. A la resta de PhD students que dirigien el laboratori quan vaig arribar, l'Alba, la Cris i el Marc. Al vostre costat hem viscut grans moments dins del lab i fora, convertint-nos en els màsters dels escape rooms. En especial, gracias a ti Alba porqué compartimos juntas pandemias, mudanzas, villancicos, cenas en tu terraza, canets rocks, y muchas charlas de viernes por la mañana, en definitiva hemos compartido muchas experiencias que llevaré siempre conmigo. També moltíssimes gràcies a tu Uri perquè m'has regalat una de les millors experiències de la meva vida. Abans que tornessis al lab pensava qui seria aquest tal Oriol Ros que tenia el seu nom escrit per tots els calaixos del lab. Qui m'hauria dit en aquell moment que gràcies a ell aniria a Harvard! De veritat, no tinc paraules per agrair-te tota l'ajuda, consells i suport d'aquests mesos, així que ho deixarem en un... quina sort que tornessis a casa!

Gràcies també a tots els mindundis amb els que vam compartir penes i alegries durant les pràctiques del TFG i el TFM. No érem ningú al lab, però amb la nostra companyia en teníem més que prou per sobreviure a l'estrès i als experiments fallits, i gaudir el màxim possible d'aquesta etapa. Sobretot, gràcies a la Sara i al Marcos, amb els qui l'aventura ha continuat després de l'etapa d'estudiants. Els cafès al Parc, durant aquests anys de tesi, en els quals reivindicàvem plegats les dures condicions de la ciència i les dificultats del dia a dia d'un estudiant de doctorat, així com el suport mutu, han sigut de gran ajuda aquests anys.

I dels mindundis als minions actuals, gràcies a tots els estudiants que han passat pel laboratori en aquests anys de tesi. La vida al laboratori ha estat més divertida gràcies a vosaltres i a les calçotades, biofestes i plans fora del laboratori que hem gaudit plegats. Sobretot a la Marina, l'Arnau i el Tomeu que van estar presents en els inicis d'aquesta etapa. D'entre tots els estudiants, els agraïments més sincers a les meves estudiants, l'Alba i la Maria (sí, durant un temps vam ser tres Albas al lab!). A la Maria, perquè et va tocar una part feixuga del projecte i entre les dues vam aconseguir treure-la endavant. Gràcies per deixar-me guiar-te durant el TFG i compartir experiències juntes més enllà de les pipetes i les espines. I sobretot, mil gràcies a tu Alba! No sé ni per on començar... Has sigut la meva primera estudiant i no puc estar més orgullosa de fins on has arribat. Tot i que la notícia va ser força inesperada, sempre m'havia fet il·lusió tenir una estudiant amb qui compartir el pes de la recerca i no hauria pogut tenir una millor aliada. I és que hem viscut i compartit tantes coses plegades en tan poc temps, que d'estudiant t'has convertit en una gran amiga. El teu recolzament, companyia i alegria al llarg d'aquests darrers anys han fet que aquest camí hagi estat molt més fàcil i divertit. Espero de tot cor poder continuar generant records plegades, ara fora del laboratori, amb més calçotades, birres (coca-cola en el meu cas), concerts, sopars, caps d'anys i tots els plans que se'ns passin pel cap. Que allò que va unir NCAM2 no ho separi el postdoc!

I falten dues de les components del quartet de PhD students tan bonic que hem fet aquests últims anys. En primer lloc, no puc deixar de donar les gràcies per tot a l'Eva. Ens vam conèixer fa uns set anys al lab, quan només érem unes mindundis, i hem recorregut plegades el camí del doctorat. No exagero si dic que aquesta tesi no seria el mateix sense tu. Durant aquests anys ens hem ajudat en tot el que podíem i ens hem recolzat quan la càrrega del lab es feia una muntanya. I és que durant la tesi hem viscut de tot! Una pandèmia ens va allunyar de la "poyata" durant força temps i va frustrar els plans de recórrer Escòcia durant la nostra primera FENS. L'experiència d'un congrés virtual no va estar malament, però ens queda pendent un viatge a terres escoceses. I per si tot això no fos suficient, a la tornada de la pandèmia, una mudança de laboratori! Mai oblidarem totes les ampolles, gradetes i capses que vam acumular en uns mesos. Però ens en vam sortir i vam continuar endavant en un nou laboratori amb vistes als arbres i a la llum del sol. A més, l'any passat vam poder treure'ns l'espina de la FENS i gaudir d'una experiència immillorable a París. Desenes d'hores en xerrades, pòsters i networking, i quan la ciència ens desbordava i no podíem més, passejades descobrint París, crepès, fondues i capvespres a la ribera del Sena. En resum, no podria haver tingut una millor companya de penes i alegries al llarg d'aquest recorregut.

I clarament gràcies també a tu Kat! Si hi ha algú en aquest laboratori que pugui comprendre el que ha estat arribar fins aquí, sense dubte, ets tu. Hem viscut situacions similars, i constatat en primera persona que la ciència no és una elecció fàcil. Escollir fer ciència és escollir dedicar-se dia a dia a ella, sovint deixant de banda allò que més t'agrada, és escollir dedicar milers d'hores a uns experiments que molts cops seran fallits, escollir viure amb la frustració i l'esgotament físic i mental. Però escollir fer ciència també és escollir l'emoció de veure com els teus esforços donen fruits, escollir una feina que t'apassiona i et brinda moments molt feliços, en definitiva, és escollir contribuir a entendre una mica millor com funciona aquest món i aquest regal que és la vida. I és que a mi la ciència m'ha ensenvat molt, però també m'ha permès conèixer grans persones com tu amb les que he viscut experiències que sempre recordaré. En resum, gràcies a les tres per formar part de la meva vida i ser part d'aquesta tesi. Aquesta etapa s'acaba però si us plau, que no acabin les trobades, els stickers, les converses, les escapades a plataforma, les alegries, les cançons o les bogeries. Us trobaré molt a faltar, però estic segura que l'amistat que hem construït aquests anys perdurarà, i és que sempre ens quedarà el Tap!

Ara toca Boston! Moltíssimes gràcies a tots els que heu format part d'aquesta increïble i inoblidable experiència. Si fa uns anys em diuen que acabaria fent una estada a Harvard no hi hauria donat crèdit. Però és que no només ha estat una gran oportunitat professional, sinó que també ha estat una gran experiència vital. I això ha estat gràcies a molta gent... De entrada, mil gracias a ti Marcela. Gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo, conocer tu proyecto y confiar en mí. A tu lado he aprendido muchísimo y he vuelto a enamorarme de la ciencia en un momento en el que todo se me hacía cuesta arriba. Así que gracias por guiarme y enseñarme tanto dentro del lab, pero también por ser mi amiga fuera de él (aunque fuera yo quien te tuviera que enseñar Boston...). Siempre llevaré conmigo nuestros cotis, copas, ratitos de peli y manta, paellas, cenas, fiestas y charlas. Thanks a lot to all my lab colleagues at the OGI, you made me feel at home although being miles away from it. Y sin duda, gracias también a la panda de la RCC por ser mi pequeño refugio en Boston, me llevo todo lo vivido juntos para siempre! Per últim, moltíssimes gràcies a les dues persones que s'han convertit en la meva família Bostoniana, a la Bet i a la Lucía. No fa falta que us digui que sense vosaltres no hauria estat el mateix. Vam viure l'experiència americana al 100%: vam veure absolutament tots els esports possibles, vam menjar totes les guarrades que vam poder i més, vam fer un mini road trip amb visita obligatòria al súper amb menjar XXL, vam viure les èpiques festes universitàries americanes, vam menjar molta pizza gratis mentre pintàvem i vam descobrir plegades Boston, una ciutat que s'ha convertit en la nostra segona llar. Gràcies Bet per ser la millor compi de pis possible (encara que ens deixessis sense forn una temporada...). I es que sense tu, literalment, no hagués tingut un sostre a Boston! Haver-te conegut i compartit aquesta experiència juntes ha estat tot un regal. Y obviamente gracias a ti, Lucía. ¡Quién me iba a decir que una sesión aburrida de bienvenida me iba a regalar a la mejor compañera de aventuras! Recorrimos Boston juntas y espero de corazón poder continuar descubriendo mundo y compartiendo vivencias únicas a tu lado. Sembla mentida que en tan poc temps us hagueu convertit en unes persones tan importants per a mi! Així que noies, espero que allò que va començar a Boston continuï a Barcelona, Anglaterra o Austràlia!

Gràcies també a tots els PhD de l'Institut i el programa de doctorat amb els que he coincidit i compartit congressos, xerrades, cafès, organització d'esdeveniments i mil moments més.

Un gràcies també a l'equip de la UB Divulga i de difusió de la ciència del Parc Científic. Hi ha una cosa que m'agrada tant o més que fer ciència, i és divulgar-la! Vosaltres heu fet possible que expliqués la meva recerca a escoles, instituts, festes de la ciència i en definitiva, a la societat. Així que gràcies perquè ho he gaudit moltíssim.

I l'apartat d'agraïments científics no pot acabar sense recordar els meus inicis. Mil gràcies Susana per descobrir-me aquest món. Em vas donar l'oportunitat d'entrar en un laboratori en un moment molt complicat de la meva vida. Aquell estiu entre nanopartícules em va ajudar a continuar endavant i em va regalar una professió que em captiva. També gràcies a tu, Cristina, la meva primera mentora científica! Aquesta tesi és en part possible gràcies a tu, i és que el teu entusiasme i passió per la investigació són contagiosos i gràcies a tu vaig decidir que volia fer el doctorat. Vaig aprendre molt al teu costat i vas fer que el meu primer contacte amb el món de la investigació fos inoblidable.

Moltes gràcies també a les meves Biomed! Vaig començar la meva carrera científica de la vostra mà quan encara no em podia ni imaginar com era treballar en un laboratori. Juntes vam sobreviure a quatre anys plens de vies de senyalització, virus o gens per aprendre. També, vam compartir moltes hores de laboratori, gespeta, jocs de taula, esmorzars i grans moments fora de la uni que ens acompanyaran per sempre. Sempre Biomed! Mil gràcies obligades als meus Cosmitis! Quan la cerca de beques per fer el doctorat em començava a pesar, va arribar una oportunitat que em va canviar la vida. A aquestes alçades ja sabreu tots que el Cosmocaixa era el meu museu preferit de petita, i avui dia ho continua sent. Així que treballar com a educadora en el museu va ser un somni fet realitat. Però és que l'experiència va ser molt millor del que hauria pogut somiar. I és que a més de gaudir com una nena amb tots els tallers i aprendre moltíssim de branques de la ciència que desconeixia, vaig conèixer un grup de gent meravellosa que s'han convertit en alguns dels meus millors amics. Hem sigut molts i és impossible anomenar-vos a un per un, però mil gràcies a tots! Gràcies Àngel i Rossend perquè els partidets de Cosmobàsquet post-laboratori m'han ajudat moltíssim a desconnectar. També, gràcies Aïda, Clara, Martí i tota la resta per les fantàstiques Cosmoescapades i calçotades que sempre recarreguen les piles. I sobretot, mil gràcies a les meves Cosmollagues: a la Paula, l'Adri, l'Eli, el Joel i la Núria. Vosaltres segurament sou els que més heu patit aquesta tesi i també els que més m'heu aconsellat i recolzat. Així que gràcies per estar al meu costat i fer més còmode el camí.

I qui millor per acabar els agraïments dels amics que amb vosaltres què hi heu estat sempre, des de que teníem tres anyets i començàvem la nostra aventura al Thau. A vosaltres, les del cole, gràcies per estar-hi des de fa tant de temps. Hem viscut i compartit tantes coses que tenim batalletes per a molts i molts anys. Els anys passen i hem tingut moments de tot, però al cap i a la fi, encara ens tenim les unes a les altres, i que sigui per molts més anys! Així que gràcies a totes, a les Clares, a l'Emmelin, a la Mónica, a la Mire, a la Ine i a la Laura.

Aquesta tesi també ha estat possible gràcies al suport de la meva família. Moltes gràcies tiets, padrins i cosins per formar part de la meva vida, cuidar-me i estar allà quan ho necessito. També gràcies a l'Olga i la Martina, que per mi sou la "meva germana gran" i la meva cosina preferida. Gràcies també als meus avis paterns, el Rafael i la Montse. No vaig tenir la sort de conèixer-vos, però m'heu regalat un pare que val or i us estaré eternament agraïda.

És impossible escriure aquest agraïment sense emocionar-me. Gràcies de tot cor a vosaltres avis per tot el que m'heu donat, i a la vida, perquè tenir-vos al meu costat ha estat una grandíssima sort. Recordar la meva infància al vostre costat em dibuixa un somriure els llavis i m'omple el cor de felicitat. Atresoro milers de records jugant a la cuineta de la galeria els estius, anant a menjar braves d'amagat, devorant els macarrons de la iaia, anant a jugar al parc, mirant el Barça plegats o tornant junts de l'escola. Gràcies iaiu, des de petita has estat el meu millor amic i m'has fet sentir la neta més afortunada del món. M'has transmès la passió pel Barça, la importància d'estimar als teus i sempre has cregut en mi. Gràcies iaia per ensenyar-me tant de la vida, pels petons i les carícies, per compartir amb mi els teus records i la teva experiència, per ajudar-me a créixer i convertir-me en la persona que soc avui dia. Res em faria més il·lusió que em poguéssiu acompanyar en aquest diax, però sé que allà on estigueu m'estareu fent costat i estareu orgullosos de la vostra nena. Us he estimat, us estimo i sempre us estimaré moltíssim.

Per últim, infinites gràcies als meus tres pilars sense els quals no hauria arribat on soc avui. Gràcies per tot papa, mama i Cris. He tingut la gran sort de néixer en el si d'una família que des de ben petita m'ha ajudat a créixer sense tallar-me les ales, una família que m'ha donat la mà quan ho necessitava i l'empenta quan em faltaven les forces. Una família que m'ha ensenyat a estimar i m'estima. Gràcies papa per ser, simplement, el millor pare que hauria pogut tenir. Des de petita m'has cuidat i protegit, m'has ensenyat a valorar el que tenim i la importància de conèixer el passat per poder construir un futur millor. Sempre has estat al meu costat per consolar-me en els moments difícils i celebrar amb mi les victòries. Vas reunir el valor per creuar l'oceà i així venir-me a veure, i crec és el millor exemple del que significa ser un bon pare, oblidar les inquietuds d'un mateix en pro de la felicitat dels fills. Gràcies perquè si avui soc científica és gràcies a tu, que vas veure clarament quina havia de ser la meva professió fins i tot abans de què jo la descobrís. T'estimo molt papa.

A tu mama, és difícil agrair-te en unes poques línies tot el que has fet per mi. No només m'has donat la vida sinó que dia a dia fas que aquesta sigui un regal. De la teva mà he crescut creient que tot era possible i m'has ensenyat que val la pena lluitar pel que més desitges. Sempre has confiat amb mi i m'has donat el valor necessari per fer les coses que més temia. Gràcies per tenir la valentia d'acompanyar-me en els primers passos de l'aventura americana. Vas fer que la por i el neguit es convertissin en il·lusió i entusiasme. Vam descobrir plegades una ciutat i un país de pel·lícula, vam gaudir i plorar juntes, i vam fer encara més fort el vincle que ens uneix. I ara, tant sols uns mesos després, ho recordo tot amb aquella nostàlgia que impregna les experiències úniques perquè van ser uns dies preciosos que sempre portaré al cor. Així que gràcies per ser un referent de dona lluitadora i valenta. Gràcies per estimar-me tant i tan bé. Jo també t'estimo moltíssim.

Els agraïments d'aquesta tesi no podien acabar amb una altra persona que no fos la meva germana petita, la persona més important a la meva vida. Mai estaré prou agraïda a la vida per haver-me regalat la millor companya d'aventures, alegries i somriures. Des de ben petites ho hem compartit tot, hem estat sempre l'una per l'altra i soc incapaç d'imaginar una vida sense tu. Perquè tu ets qui m'escolta i em comprèn, qui m'abraça i qui em consola, qui m'anima i qui m'encoratja. Ens cuidem i protegim l'una a l'altra, i la felicitat no és complerta si no és compartida, perquè juntes som el millor dels equips. Així que si aquesta tesi avui és una realitat, és gràcies a tu. Gràcies per fer que els moments durs ho fossin menys, pels dinars i escapades gaudits, per celebrar amb mi cada una de les petites victòries, per animar-me sempre a continuar i sobretot per creure amb mi. No et puc estimar més sis.

Cris, mama, papa i avis, aquesta tesi es tant meva com vostra.

Gràcies a tots per fer-la possible.

Reserveu-vos el dret a pensar, perquè ni que sigui pensar erròniament és millor que no pensar.

Hipàtia

Quan hagis de triar entre una cosa difícil o una de fàcil, tingues sempre present que les coses difícils acostumen a ser sempre més divertides.

Samantha Cristoforetti

ABSTRACT

The central nervous system (CNS) is a fascinating and complex structure formed by millions of interconnected neurons that govern essential cognitive functions such as memory and learning. The development and maintenance of this system rely on genetic programs that regulate the spatial and temporal expression of multiple genes. Among them, cell adhesion molecules (CAMs) are key components of the nervous system with relevant functions in signal transductions. These proteins exhibit a wide range of structural and functional diversity, allowing them to regulate different processes, including the renewal and proliferation of neural stem cells (NSCs), neuronal migration and differentiation, and the integration of neurons into functional circuits. The present thesis investigates the role of Neural cell adhesion molecule 2 (NCAM2) in neuronal development and adult plasticity.

NCAM2, also known as OCAM and RNCAM, is a membrane glycoprotein belonging to the NCAM family. This family comprises two members, NCAM1 and NCAM2, which originate from genomic duplication events. Alternative splicing of *Ncam2* produces two isoforms of the protein: NCAM2.1 and NCAM2.2. Both isoforms share an extracellular domain composed by five immunoglobulin-like modules (IgI-IgV) and two fibronectin type III modules (FnIII1-2). Through the extracellular domain, they establish *trans* homophilic interactions that are responsible for a large part of their functions. The isoforms exhibit distinct intracellular domain: NCAM2.1 has a transmembrane domain and a cytoplasmic tail while NCAM2.2 is attached to the membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. This structural diversity led to different cellular localization, interactions, and biological functions.

The role of NCAM2 have been extensively studied in the olfactory bulb, where it participates in neurite growth, axo-dendritic compartmentalization, and selective axon fasciculation. However, its role outside of this region has remained largely unexplored to date. The main objective of this thesis has been to determine the functions of NCAM2 protein in the cortex and hippocampus. The resultuts obtained revealed that NCAM2 regulates neuronal polarization and morphogenesis. Silencing the protein during neuronal polarization events leads to aberrant dendritic and axonal phenotypes. The mechanisms that vehiculate NCAM2 functions in neuronal morphogenesis include the interaction with cytoskeletal proteins (actin, tubulin, and neurofilaments), cytoskeleton-associated proteins (MAP1B, MAP2, or CAPZ), and other intercellular effectors (CaMKII or 14-3-3).

In the adult nervous systems, we analyze the effects of NCAM2 protein on the regulation of hippocamapl adult neural stem cells (NSCs) and synaptic plasticity in the hippocampus. The results in the context of neurogenesis revealed that regulated levels of *Ncam2* are necessary for the activation of quiescent NSCs, division and neuronal differentiation. Increased levels of NCAM2 lead to a partial arrest of progenitor cells delaying the normal course of the neurogenic events. In synaptic plasticity, our data suggest that NCAM2 is necessary for synapse formation and maintenance during adulthood. The disruption of *Ncam2* leads to a constriction and a reduction in dendritic spines density. Conversely, upregulated levels of the gene may promote contact stabilization by increasing the size of dendritic spines.

In summary, the results obtained in this thesis highlight the relevance of NCAM2 in neuronal development and plasticity, thus reinforcing the crucial role of CAMs in the functioning of the CNS. The NCAM2 gene has been associated with neurodevelopmental disorders or neurodegenerative diseases such as Autism Spectrum Disorders, Down syndrome, or Alzheimer's disease. The evidence provided in the thesis could enhance our understanding of the neurogenic and synaptic deficits that occur in these pathologies and open new promising avenues for future research.

Índex de continguts

Resum	1
Taula de continguts	
Taula de figures	7
Llista d'abreviacions	9
1. Introducció	15
Capítol 1. Desenvolupament del sistema nerviós	18
1.1 Neurogènesi embrionària	19
1.1.1 Les cèl·lules mare neuronals	19
1.1.2 El microentorn: la zona ventricular	22
1.1.3 Corticogènesi	24
1.1.4 Formació de l'hipocamp	
1.2 Migració neuronal	
1.2.1 La laminació del còrtex	29
1.2.2 La migració a l'hipocamp	
1.3 Diferenciació neuronal	
1.3.1 Establiment de la polaritat neuronal	
1.3.2 Regulació de la polarització	
1.3.3 El paper del citoesquelet	
1.3.4 Elongació i maduració de l'axó	
1.3.5 Formació i maduració de les dendrites	41
1.4 Sinaptogènesi	42
Capítol 2. Plasticitat neuronal	46
2.1 Plasticitat sinàptica	46
2.1.1 Plasticitat presinàptica	
2.1.2 Plasticitat postsinàptica: les espines dendrítiques	49
2.2 Neurogènesi adulta	53
2.2.1 Cèl·lules mare neuronals	54
2.2.2 Zones neurogèniques	56

2.2.3 Regulació de la neurogènesi adulta	59
Capítol 3. NCAM2	63
3.1 Molècules d'adhesió neuronal	63
3.1.1 Estructura	63
3.1.2 Funcions	66
3.2 NCAM2	71
3.2.1 El gen	71
3.2.2 La proteïna	73
3.2.3 Funcions	74
3.2.4 Lligands	76
3.2.5 Patologies neu r ològiques	77
2. Objectius	79
3. Resultats	83
Capítol 1. NCAM2 Regulates Dendritic and Axonal Differentiation through the Cytoskeletal Proteins MAP2 and 14-3-3	91
Capítol 2. New Partners Identified by Mass Spectrometry Assay Revea Functions of NCAM2 in Neural Cytoskeleton Organization	al 115
Capítol 3. Regulation of young adult neurogenesis and neuronal differentiation by Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2)	139
Capítol 4. Unraveling the role of Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2 in synaptic plasticity	201
4. Discussió	237
Capítol 1. NCAM2 en el desenvolupament neuronal	240
1.1 NCAM2 en la regulació de les NSCs embrionàries	240
1.2 NCAM2 en el control de la migració neuronal	241
1.3 Efecte de NCAM2 en la diferenciació neuronal	243
Capítol 2. NCAM2 en la regulació de la plasticitat sinàptica	249
2.1 NCAM2 en els compartiments sinàptics	249
2.2 Les implicacions de NCAM2 en sinaptogènesi	250
	054

Capítol 3. El paper de NCAM2 en la neurogènesi adulta	255
3.1 El microentorn de les cèl·lules mare neuronals adultes	255
3.2 Els mecanismes moleculars de NCAM2 en la regulació de la neurogènesi adulta	258
Capítol 4. NCAM2 en els desordres neurològics	260
4.4.1 Trastorns de l'espectre autista	260
4.4.2 Síndrome de Down	262
4.4.3 Malaltia d'Alzheimer	262
5. Conclusions	265
5. Referències	269

Taula de figures

Figures de la introducció

Figura 1.1. Compartimentalització del sistema nerviós	18
Figura 1.2. Corticogènesi	25
Figura 1.3. Formació de l'hipocamp	27
Figura 1.4. Establiment de la polaritat neuronal in vitro i in vivo	32
Figura 1.5. Vies de senyalització en la polarització neuronal	34
Figura 1.6. Retroalimentació positiva i negativa en les neurites	36
Figura 1.7. Dinàmica del citoesquelet en la polaritat neuronal	37
Figura 1.8. L'estructura del con de creixement i l'elongació de l'axó	40
Figura 1.9. Formació de les connexions sinàptiques	44
Figura 1.10. Estructura de les espines dendrítiques	50
Figura 1.11. Canvis estructurals en les espines induïts per la LTP i la LTD.	52
Figura 1.12. Neurogènesi adulta a la zona subventricular	57
Figura 1.13. Neurogènesi adulta a la zona subgranular de l'hipocamp	58
Figura 1.14. Molècules d'adhesió cel·lular	66
Figura 1.15. Localització i estructura del gen <i>Ncam2</i>	72
Figura 1.16. Estructura de NCAM2	74

Figures de la discussió

Figura 4.1 Efecte de NCAM2 en el desenvolupament neuronal	.247
Figura 4.2 El paper de NCAM2 en la regulació de la plasticitat neuronal adulta	.256
Figura 4.3 Implicació de NCAM2 en l'ASD, la síndrome de Down i	
la malaltia d'Alzheimer	.261

Abreviacions

ABP	Proteïnes associades a l'actina, d'Actin binding proteins
ADAM10	A disentegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
ADP	Adenosina difosfat, d'adenosine diphosphate
AIS	Fragment inicial de l'axó, d'axon initial segment
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
АроЕ	Apoliproteïna E; d'Apoliprotein E.
ApoER2	Receptor d'apoliproteïna E 2, d'Apoliprotein E receptor 2
aPKC	Proteïna quinasa C activada, de activated protein kinase C
Arp2/3	Proteïna relacionada a l'actina 2/3; d'Actin related protein 2/3
ATP	Adenosina trifosfat, d'adenosine triphosphate
ASD	Trastorns de l'espectre autista, de Autism spectrum disorders
BACE-1	Beta-side amyloid precursor cleaving enzyme 1
bHLH	Basic helix loop helix
BLBP	Proteïna d'unió a lípids, de Brain lípid binding protein
BMP	Proteïna morfogènica de l'os, de Bone morphogenic protein
BDNF	Factor de creixement necrotròfia derivat del cervell, de Brain-derived
	neurotrophic factor
BP	Cèl·lula bipolar, de <i>bipolar cell</i>
BrdU	Bromodesoxiuridina; de 5-bromo-2-deoxyuridine
СА	Cornu Ammoni
CAM	Molècula d'adhesió cel·lular, de cell adhesion molecule
cAMP	Adenosina monofosfat cíclica, de cyclic adenosine monophosphate
CaMKII	Calci/calmodulina quinasa II
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CDH	Cadherina
СН	Cortical hem
ChP	Plexe coroide, de choroid plexus
CNV	Variació en el nombre de còpies, de copy number variation.

СР	Placa cortical, de cortical plate
CREB	cAMP response element-binding
CRMP2	Proteïna mediadora de resposta a la col·lapsina, de Collapsin response
	mediator protein 2
CSF	Líquid cerebrospinal, de Cerebrospinal fluid
CUX1	Cut like homeobox 1
CUX2	Cut like homeobox 2
Dab1	Disabled-1
DCX	Doublecortin
DG	Gir dentat, de dentate gyrus
DNA	Àcid desoxiribonucleic; de deoxyribonucleic acid
DNE	Neuroepiteli dentat, de dentate neuroepithelium
DSCAM	Molècula d'adhesió cel·lular associada a la síndrome de Down; de
	Down syndrome cell adhesion molecule
EC	Còrtex entorrinal, de enthorinal cortex
Eef1A	Factor d'elongació de la traducció eucariòtica 1 alfa; d'Elongation
	factor 1 alpha
Eef1B	Factor d'elongació de la traducció eucariòtica 1 beta; d'Elongation
	factor 1 beta
Eef1D	Factor d'elongació de la traducció eucariòtica 1 beta; d'Elongation
	factor 1 delta
EGF	Factor de creixement epidèrmic, de Epidermic growth factor
EGFR	Receptor del factor de creixement epidèrmic, de Epidermic growth
	factor receptor
FAK	Quinasa d'adhesió focal, de Focal adhesion kinase
FGF	Factor de creixement fibroblàstic, de Fibroblast growth factor
FGFR	Receptor del factor de creixement fibroblàstic, de Fibroblast growth
	factor receptor
Fn	Fibronectina
GABA	Àcid gamma-aminobutíric, de Gamma-aminobutyric acid
GCL	Capa de cèl·lules granulars, de granule cell layer

GL	Capa glomerular, de <i>glomerular layer</i>
GLAST	Transportador de glutamat/aspartat, de glutamate/aspartate transporter
GFAP	Proteïna acídica fibril·lar glial, de glial fibrillary acidic protein
GFP	Proteïna verda fluorescent, de Green fluorescent protein
GSK3β	Quinasa sintetitzadora de glicogen 3-beta, de Glycogfen synthase kinase
	3-beta
GTP	Guanosina trifosfat, de guanosine triphosphate.
GWAS	Estudi d'associació del genoma, de genome wide association study
HNE	Neuroepiteli hipocampal, de hippocamal neuroepithelium
IgCAM	Molècula d'adhesió cel·lular de la superfamília de les
	immunoglobulines, de immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule
Ig	Immunoglobulina
IGF-1	Factor de creixement d'insulina 2, de insulin growth factor 1
IGF-2	Factor de creixement d'insulina 2, de insulin growth factor 2
IPC	Progenitor intermedi, de intermediate progenitor cell
IZ	Zona intermèdia, de intermediate zone
L1CAM	Molècula d'adhesió cel·lular L1; de L1 cell adhesion molecule
LFS	Estimulació de baixa freqüència, de low frequency stimulation
LIMK	Quinasa de LIM, de LIM kinase
LK1B	Quinasa del fetge B1; de Liver kinase B1
LNS	Laminin, neurexin, sex-hormone binding globulin domain
LTD	Depressió a llarg termini, de long term depression
LTP	Potenciació a llarg termini, de long term potentiation
MAP1B	Proteïna associada als microtúbuls 2, de Microtubule associated protein 2
MAP2	Proteïna associada als microtúbuls 1B, de Microtubule associated
	protein 1B
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens, de mitogen activated kinase 2
MP	Cèl·lula multipolar, de multipolar cell
MZ	Zona marginal, de marginal zone
NCAM1	Molècula d'adhesió neural 1, de neural cell adhesion molecule 1
NCAM2	Molècula d'adhesió neural 1, de neural cell adhesion molecule 2

NDEL1	Proteïna de distribució nuclear tipus nudE 1, de Nuclear Distribution
	protein nudE-like 1
NEC	Cèl·lula neuroepitelial, de neuroepithelial cell
NeuN	Neuronal nuclei
NgCAM	Molècula d'adhesió neuronal neuronaglia, de neuronglia cell adhesion
	molecule
NGN2	Neurogenin-2
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
NrCAM	Molècula d'adhesió neuronal, de neuronal cell adhesion molecule
NSC	Cèl·lula mare neuronal, de Neural stem cell
NT-3	Neurotrofina 3, de neurotrophin 3
PAR3	Partioning defect complex 3
PAR6	Partioning defect complex 6
Pax6	Paired box protein 6
PEDF	Factor derivat de l'epiteli pigmentari, de Pigment epithelium-derived
	factor
PEST	Seqüència rica en prolina, àcid glutàmic, serina i treonina.
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat, de Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-
	triphosphate
PI3K	Quinasa fosfoinositol 3, de Phosphoinositol 3 kinase
PKA	Proteïna quinasa A, de Protein kinase A
PKB	Proteïna quinasa B, de Protein kinase B
РР	Preplaca, de <i>preplate</i>
PrP	Proteïna priònica, de Prionic protein
PSA	Àcid polisiàlic, de Polysialic acid
PSD	Densitat postsinàptica, de postsynaptic density
PSD-95	Densitat postsinàptica 95, de postsynaptic density 95
REST	Factor de transcripció silenciar RE1, de RE1-silencing transcription
	factor
RGCs	Cèl·lula de la glia radial, de <i>radial glial cells</i>

ROCK	Proteïna quinasa associada a Rho, de Rho associated protein kinase
RMS	Corrent migratori rostral, de rostral migratory stream
RNAm	Àcid ribonucleic missatger, de messenger ribonucleic acid
SAP	Progenitor subapical, de subapical progenitor
SHH	Sonic hedgehog
SLIT2	Proteïna homòloga a Slit 2, de Slit2 homolog protein
SGZ	Zona subgranular, de subgranular zone
SOX1	Sex determinin region Y-box 1
SOX2	Sex determinin region Y-box 2
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Polimorfisme de gen únic, de single nucleotide polymorphism
SP	Subplaca, de subplate
STDP	Spike-time dependent plasticity
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SVZ	Zona subventricular, de subventricular zone
SynCAM	Molècula d'adhesió sinàptica, de synaptic cell adhesion molècules
TAG-1	Glicoproteïna axonal transitòria, de Transient axonal glicoprotein
ТАР	Progenitor amplificador transitori, de transient amplifying progenitors
TBR1	T-box brain protein 1
TBR2	T-box brain protein 2
TFGβ	Factor de creixement transformador β , de <i>Transforming growth factor</i> β
TrkB	Receptor de tropomiosina quinasa B, de Tropomyosin receptor kinase B
TSP-1	Trombospondina-1
VCAM1	Molècula d'adhesió cel·lular vascular 1, de Vascular cell adhesion
	molecule 1
VGCC	Canal de calci dependent de voltatge, de voltatge-gate calcium channels
VLDR	Receptor de la lipoproteïna de baixa densitat, de Very low-density
	lipoprotein receptor
VZ	Zona ventricular, de ventricular zone
WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein



El Sistema Nerviós és una de les estructures més fascinants i misterioses de la natura. Des de les funcions més bàsiques d'un organisme, com respirar o moure's; a les més complexes, com pensar, recordar o imaginar, són possibles gràcies a les xarxes neuronals que el conformen. Els circuits neuronals que integren el sistema s'originen durant el desenvolupament embrionari en un procés que implica la coordinació d'una gran diversitat de molècules.

Aquests circuits neuronals presenten la sorprenent capacitat de convertir els records, els sentiments o els pensaments en canvis en la seva activitat. D'aquesta manera, l'ésser humà pot adaptar-se als entorns canviants i emmagatzemar les experiències viscudes al llarg de tota la vida. El conjunt de processos que participen en el desenvolupament i la plasticitat del sistema dibuixen un escenari complex amb múltiples actors, molts dels quals esperen a ser revelats.

Capítol 1. Desenvolupament del Sistema Nerviós

L'origen del sistema nerviós és fruit de l'acció coordinada en el temps i l'espai de programes genètics d'alta complexitat i precisió que s'inicien durant el desenvolupament embrionari. En mamífers, una de les etapes embriològiques més rellevants és la gastrulació. Durant aquest període, una reorganització massiva de les cèl·lules de la blàstula finalitza amb la formació de les tres fulles embrionàries: l'endoderma, el mesoderma i l'ectoderma. En aquest punt, i a partir de diversos esdeveniments de diferenciació i d'organogènesi, s'inicia la formació dels teixits i dels òrgans de l'organisme. L'alliberament de diferents senvals per part de la notocorda durant la inducció neural convertirà l'ectoderma dorsal en la placa neural. El plegament de la placa neural donarà lloc a la formació del tub neural, en un procés anomenat neurulació que marca l'inici del sistema nerviós central (SNC). Fruit d'una ràpida i no uniforme divisió de les cèl·lules del tub neural durant les primeres fases del desenvolupament; es comencen a formar regions especialitzades i es visualitza una estructura amb tres vesícules: el prosencefal, el mesencefal i el romboencèfal. La compartimentalització i la subdivisió d'aquestes vesícules acaba generant les estructures de l'encèfal, que juntament amb la medul·la espinal, conformen el SNC (Figura 1.1). Es tracta d'un procés altament regulat per l'expressió de patrons genètics específics entre els quals juguen un paper decisiu Shh, Hox, Pax o la família de Wnt (Franco & Müller, 2013; Leung et al., 2019).



Figura 1.1. Compartimentalització del sistema nerviós.

Representació esquemàtica del tub neuronal en els diferents estadis del desenvolupament. A l'esquerra, es representa la subdivisió del tub neural. Aquesta divisió dona lloc, inicialment, a les tres vesícules primordials: el prosencèfal, el mesencèfal i el romboencèfal. En etapes posteriors, s'oberva la subcompartimentalització del tub neural en cinc vesícules que formaran les estrcutures del sistema nerviós adult: el telencèfal, el diencèfal, el mesencèfal, el metencèfal i el mielencèfal. A la part dreta de la figura es representa una
secció sagital d'un embrió on es mostra la distribució de les cinc vesícules i la medul·la espinal. Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida a *Sotelo, 2004*.

1.1 Neurogènesi embrionària

La neurogènesi embrionària és el procés per mitjà del qual es generen les cèl·lules del sistema nerviós durant el desenvolupament. Les neurones i les cèl·lules de la glia s'originen a partir de les cèl·lules mare neuronals (NSCs; de *neural stem cells*) i els progenitors neurals. El procés de neurogènesi inclou la divisió, migració i diferenciació de les NSCs (Agirman et al., 2017; Hanashima & Toma, 2015; Park et al., 2022). Les noves neurones generades, un cop arriben a la seva destinació, maduren, formen les connexions sinàptiques i esdevenen funcionalment competents.

1.1.1 Les cèl·lules mare neuronals

Les cèl·lules mare somàtiques contribueixen a l'ontogènesi, l'homeòstasi i la regeneració dels teixits de l'organisme (Shin et al., 2015). Els dos trets principals que les defineixen són la seva capacitat d'autorenovació i la multipotència. Així doncs, les cèl·lules mare poden dividir-se un nombre il·limitat de vegades i produir diversos tipus de cèl·lules diferenciades. En el cas del sistema nerviós dels mamífers, el conjunt de NSCs constitueix una població heterogènia de cèl·lules, sovint difícil de categoritzar, amb diferents graus de multipotència. Els dos integrants principals d'aquesta població durant el desenvolupament embrionari són les cèl·lules neuroepitelials (NECs; de neuroepitelial cells) i les cèl·lules de la glia radial (RGCs, de radial glial cells) (Eze et al., 2021; Taverna et al., 2014). Ara bé, en el procés de neurogènesi també hi participen unes cèl·lules amb una capacitat d'autorenovació i un destí cel·lular més restringits anomenades progenitors neurals. El terme progenitor neural inclou diferents tipus de cèl·lules en funció de la seva ubicació i tipus de divisió cel·lular. En concret, els progenitors neurals es poden classificar en progenitors amplificadors transitoris (TAP; de transient amplifying progenitors), progenitors subapicals (SAP; de subapical progenitors) i progenitors intermedis (IPC; de intermediate progenitor cells) (Taverna et al., 2014). D'entre ells, els progenitors neurals més ben caracteritzats són els IPCs els quals contribueixen de manera destacada a la formació de neurones.

Cèl·lules neuroepitelials. Les NECs són les cèl·lules mare primerenques del SNC. Es tracta de progenitors apicals altament polaritzats al llarg de l'eix apicalbasal amb característiques morfològiques de cèl·lules epitelials (Agirman et al., 2017; Eze et al., 2021; Götz & Huttner, 2005; Lindsey et al., 2018; Taverna et al., 2014; Urbán & Guillemot, 2014). Les NECs poden ser detectades a través de l'expressió de marcadors epitelials com el filament intermedi Nestina o l'Ocludina, molècules d'adhesió com les cadherines o factors de transcripció com Sox2 o Sox1. A nivell transcriptòmic, les NECs presenten una expressió enriquida en gens com Hmga2 i Cend1 que promouen la progressió del cicle cel·lular (Di Bella et al., 2021; Ruan et al., 2021). El cos cel·lular de les NECs es situa en la superfície luminal del tub neural i presenta dues prolongacions, una d'apical i una de basal. La prolongació apical s'endinssa en el lumen del tub neural permetent la detecció d'estímuls provinents de l'interior de la cavitat. En l'altre extrem, la prolongació basal estableix contactes, mediats per les integrines, amb la laminina de la làmina basal (Arai & Taverna, 2017; Kosodo & Huttner, 2009). L'establiment i el manteniment d'aquesta polaritat apico-basal és possible gràcies a la distribució diferencial dels components de la membrana plasmàtica, i a la formació d'unions específiques cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular (Bian, 2013; Borrell & Reillo, 2012; Gennarini & Furley, 2017; Götz & Huttner, 2005). Entre aquestes unions, destaquen les unions adherents establertes per les N-cadherines en la membrana apical de les cèl·lules (Arai & Taverna, 2017; Miyamoto et al., 2015). Una última característica de les NECs és el moviment del nucli a través de l'eix apical-basal durant la divisió cel·lular, un fenomen que es coneix com a migració nuclear intercinètica (Arai & Taverna, 2017; Götz & Huttner, 2005; Taverna et al., 2014).

Cèl·lules de la glia radial. Les RGCs deriven de les NECs de les quals hereten les característiques epitelials, la polaritat apico-basal i la migració intercinètica nuclear. Les cèl·lules poden ser identificades gràcies a l'expressió de marcadors epitelials com la Nestina, molècules d'adhesió com la N-cadherina i factors de transcripció com Sox2 o Pax6. Un tret diferencial respecte les NECs és l'aparició de característiques d'astròglia com els grànuls de glicogen i marcadors com el Transportador de glutamat específic (GLAST; de Glutamate/aspartate transporter), la Proteïna d'unió a calci S100B, la Proteïna d'unió a lípids (BLBP; de Brain lípid binding protein) o la Proteïna acídica fibril·lar glial (GFAP; de Glial fibrilar acidic protein) (Götz & Huttner, 2005; Lindsey et al., 2018; Miranda-Negrón & García-Arrarás, 2022). Les anàlisis transcripctòmiques realitzades en aquestes poblacions revelen una expressió dinàmica de gens implicats en la divisió cel·lular, la identitat dels progenitors i l'especificació del llinatge (Mki67, Aspm, Cenpe, Cenpf, Id4, Hes5). Aquesta expressió de gens varia al llarg del desenvolupament: en les primeres etapes del expressen alts nivells de Lix1, Cend1 i Gpc1, en etapes posteriors es detecta una major expressió de Nfix, Ndgr2 i Aldoc, i finalment, les RGCs tardanes presenten una elevada expressió de reguladors de la transcripció com Pou3f2, Zbtb20 i Nfia/Nfib/Nfix (Ding et al., 2022; Ruan et al., 2021).

A nivell morfològic, les cèl·lules ubicades a la zona ventricular (VZ; de *ventricular zone*) estenen dues prolongacions, una apical i una basal. El procés apical es troba en contacte amb l'interior del lumen del tub neural des d'on contribueix a la

captació d'estímuls que regulen el comportament de les RGCs. La prolongació basal s'ancora a la superfície pial i forma una bastida que permet la migració de les neurones formades. A mesura que el radi de la capa cortical augmenta degut a la generació de les noves neurones, el procés basal s'allarga (Arai & Taverna, 2017). De manera similar a les NECs, la polaritat apico-basal és establerta i mantinguda a partir de la distribució diferencial de components de la membrana, les unions entre cèl·lules i amb la matriu extracel·lular i la distribució citoplasmàtica d'alguns orgànuls com el reticle endoplasmàtic (Arai & Taverna, 2017).

La posició de les RGCs durant la divisió cel·lular permet diferenciar-les en progenitors apicals i progenitors basals. Les RGCs apicals en dividir-se poden donar lloc a les RGCs basals. Aquestes darreres cèl·lules no presenten un procés apical i realitzen la mitosis en la zona subventricular (SVZ; de *subventricular zone*), una segona zona germinal localitzada a la part basal de la VZ. De manera directa o indirecta, el conjunt de RGCs donen lloc a la majoria de les neurones i les cèl·lules de la glia que conformaran el sistema nerviós. Alguns estudis assenyalen que l'especificació del destí cel·lular podria estar predeterminada i que cada progenitor només podria donar lloc a un tipus de cèl·lula (Taverna et al., 2014).

Progenitors intermedis. Els IPCs s'originen per mitosi de les NECs i les RGCs, però no presenten polaritat apico-basal (Hevner, 2019; Noctor et al., 2004; Pebworth et al., 2021; Taverna et al., 2014). Es caracteritzen per l'expressió de factors de transcripció com Tbr2, CUX1 i CUX2. Els estudis de transcriptòmica han revelat l'existència de diferents subgrups d'IPCs en funció de l'expressió de gens proliferatius com l'*Eomes* i gens relacionats amb el llinatge neural com *Neurog2* o *Neurod1* (Bedogni & Hevner, 2021; Di Bella et al., 2021; Ruan et al., 2021). Aquests progenitors basals situats a la SVZ sense adhesió a la làmina basal (Arai & Taverna, 2017; Bedogni & Hevner, 2021; Götz & Huttner, 2005; Hevner, 2019; Noctor et al., 2004) presenten una capacitat d'autorenovació limitada i una multipotència més restringida.

Durant el desenvolupament, l'acció coordinada dels diferents tipus de progenitors permet construir la complexa arquitectura del SNC (Agirman et al., 2017; Eze et al., 2021; Götz & Huttner, 2005; Solozobova et al., 2012; Urbán & Guillemot, 2014). Segons l'etapa del procés neurogènic predominaran unes modalitats de divisió cel·lular o unes altres. Les divisions de les NSCs poden ser asimètriques o simètriques, segons la identitat de les cèl·lules filla (Taverna et al., 2014). En les divisions simètriques proliferatives es generen dues cèl·lules filla idèntiques a la cèl·lula progenitora. En canvi, en les divisions simètriques consumidores, les dues cèl·lules filles són idèntiques entre elles però diferents a la cèl·lula mare. Les NECs o les RGCs poden experimentar divisions simètriques proliferatives per tal d'expandir la població inicial de progenitors. Els IPCs poden dur a terme divisions simètriques proliferatives per augmentar la superfície de la SVZ i la població de progenitors (Hansen et al., 2010; Taverna et al., 2014), o bé divisions simètriques consumidores per incrementar la producció de neurones.

Les divisions asimètriques es donen quan les dues cèl·lules filla tenen diferents identitats. En les divisions asimètriques autorenovadores es genera una nova cèl·lula mare i una cèl·lula filla més diferenciada. Les RGCs poden realitzar divisions asimètriques autorenovadores en les quals s'obté una altra RGCs i una cèl·lula més diferenciada, que pot ser un IPC o una neurona (Mira & Morante, 2020; Taverna et al., 2014). També, hi poden haver divisions asimètriques consumidores en les quals es formen dues cèl·lules més diferenciades, però diferents entre elles. Aquest és el cas de les divisions de les RGCs en les quals es forma un IPC i una neurona. L'asimetria de les cèl·lules filles podria estar relacionada amb l'herència de components subcel·lulars i molècules en el moment de la mitosi (Knoblich, 2008; Lancaster & Knoblich, 2012; Taverna et al., 2014).

1.1.2 El microentorn: la zona ventricular

El comportament, la divisió i la multipotència de les cèl·lules mare venen determinats pel seu microentorn o nínxol neurogènic. En les primeres etapes, les divisions simètriques de les NECs permeten la formació de diferents capes entorn al lumen del canal. La capa més interna és la VZ, considerada el lloc principal de residència de les NSCs. En aquesta regió convergeixen la multitud de factors intrínsecs i extrínsecs que regulen el comportament i la capacitat regenerativa de les NSCs (Mira & Morante, 2020). Les molècules senyal són transduides per les NSCs i activen cascades de senyalització que controlen la divisió i diferenciació de les NSCs a través de reguladors transcripcionals (p. ex: Sox2, bHLH, Pax6, NGN2, Tbr1/2) i remodeladors de la cromatina (Bjornsson et al., 2015). Els components principals de la zona neurogènica que emeten o vehiculen els senyals fins a les NSCs són:

Vasculatura. L'inici de la neurogènesi coincideix temporalment amb la vascularització del tub neural. La comunicació bidireccional entre els vasos sanguinis i les NSCs promou la vascularització de la zona, regula la proliferació de les NSCs i controla la seva diferenciació (Tata et al., 2016; Vogenstahl et al., 2022). Les prolongacions basals i apicals de les RGCs estableixen contactes amb els vasos de la superfície pial i el plexe paraventricular que promouen el creixement i l'estabilització dels vasos sanguinis. En el procés també hi participen molècules senyal com Wnt, l'àcid retinoic o el Factor de creixement transformador $\beta 2$ (TFG $\beta 2$; de *Transforming growth factor*) (Bjornsson et al., 2015). Paral·lelament, les cèl·lules endotelials de la vasculatura promouen la renovació de les NSCs i la neurogènesi a través de la senyalització per Notch. Les molècules Efrina B2 (o

EphrinB2) i Jagged expressades per les cèl·lules endotelials també controlen el manteniment de les cèl·lules mare (Morante-Redolat & Porlan, 2019). Per últim, els perícits, unes cèl·lules de suport dels vasos, regulen la divisió de les cèl·lules limitant els factors que arriben a les NSCs des del torrent (Bjornsson et al., 2015).

Líquid cefaloraquidi i plexe coroide. La composició del líquid cefaloraquidi (CSF, de *cerebrospinal fluid*) de l'interior del tub neural és modificada per l'activitat de les NSCs i el plexe coroide (ChPs; de *choroid plexuses*). El ChP és una capa de cèl·lules epitelials en contacte amb la xarxa vascular que controla el pas de molècules al CSF. El ChP produeix i secreta morfògens implicats en el manteniment i renovació de les cèl·lules mare (p. ex.: BMP7, IGF-2, Wnt, SHH, FGF) (Huang et al., 2010; Johansson et al., 2013; Lehtinen et al., 2011; Segklia et al., 2012; Zappaterra & Lehtinen, 2012), la formació dels IPCs (Wnt), la diferenciació dels progenitors a tipus neurals (BMPs, Wnt) o altres tipus cel·lulars (Wnt en la fase tardana de la neurogènesi) i la migració de les neurones (SLIT2) (Bjornsson et al., 2011; Segklia et al., 2012; Zappaterra & Lehtinen, 2012).

Components cel·lulars. El nínxol conté un grup heterogeni de cèl·lules integrat per les NSCs, els progenitors neurals, la progènie i les cèl·lules de suport. Les interaccions que s'estableixen entre les diferents cèl·lules regulen el comportament de les NSCs. Per exemple, les IPCs i les neurones formades poden regular l'autorenovació i diferenciació de les RGCs a través de Notch. Un altre exemple és el paper de les cèl·lules residents del sistema immune, la micròglia, que secreten factors de creixement i citoquines que afecten al procés neurogènic i controlen el nombre de progenitors per fagocitosi (Bjornsson et al., 2015; Mira and Morante,2020).

Matriu extracel·lular i molècules d'adhesió cel·lular. La matriu extracel·lular proporciona un suport físic a les NSCs. Les interaccions entre les cèl·lules i els components de la matriu extracel·lular, com la laminina, són l'inici de cascades de senyalització cel·lular que regulen la proliferació dels progenitors (Bjornsson et al., 2015; Long & Huttner, 2019; López-Mengual et al., 2022). Les interaccions amb la matriu són establertes per molècules d'adhesió cel·lular (CAMs; de *cell adhesion molecules*), uns elements de l'arquitectura del nínxol neurogènic amb papers clau en la transducció de senyals. La seva diversa implicació funcional en la regulació de les NSCs es detallarà en el tercer capítol.

1.1.3 Corticogènesi

En el SNC el procés de neurogènesi té lloc en totes les regions del tub neural seguint uns patrons espacials i temporals específics al llarg dels eixos caudal-rostral, ventral-dorsal i lateral-medial. Una de les regions, però, on la següència d'esdeveniments ha estat més ben caracteritzada és el neocòrtex (Figura 1.2). Aquesta estructura, evolutivament única, presenta un total de sis capes i és el centre físic de les funcions cognitives superiors (Ruan et al., 2021). El còrtex primordial emergeix durant l'embriogènesi a partir de les vesícules telencefàliques formades pel neuroepiteli (Agirman et al., 2017; Borrell & Reillo, 2012; Götz & Huttner, 2005; Taverna et al., 2014). A l'inici de la corticogènesi (E9.5), les NECs formen un tub amb un canal central o lumen. La capa de NECs mostra un aspecte pseudoestratificat, degut a la posició dels nuclis resultant del moviment de migració nuclear intercinètica (Götz & Huttner, 2005). En les primeres etapes del procés, les NECs realitzen divisions simètriques proliferatives per tal d'incrementar la població de progenitors i ampliar l'àrea del primordi cortical. Les primeres rondes de divisió de les NECs finalitzen amb la transformació de la població en RGCs entorn els dies 10 i 12 del desenvolupament (E10-E12) dels ratolins (Agirman et al., 2017; Attardo et al., 2008; Borrell & Reillo, 2012; Florio & Huttner, 2014; Noctor et al., 2004; Paridaen & Huttner, 2014). Durant la transició, les cèl·lules adquireixen marcadors de cèl·lules de la glia i es modifiquen les unions adherents entre les cèl·lules veïnes (Mira & Morante, 2020). També es modifica l'expressió gènica, per exemple, el factor Hes 3 és regulat a la baixa mentre que Hes5 augmenta la seva expressió (Miranda-Negrón & García-Arrarás, 2022). La transició de NECs a RGCs ve regulada per múltiples factors entre els quals hi ha factors solubles com el Factor de creixement fibroblàstic (FGF; de Fibroblast growth factor) (Ferent et al., 2020; Sahara & O'Leary, 2009).

La majoria del parènquima cortical deriva de les RGCs, ja sigui de manera directa o indirecta a partir de la producció d'IPCs, a través de divisions asimètriques o simètriques. La primera fase de la corticogènesis és eminentment neurogènica i es pot estendre fins a les primeres etapes postnatals, mantenint-se només en regions específiques durant l'etapa adulta (**Figura 1.2**) (Gage, 2019; Götz & Huttner, 2005; Kempermann et al., 2015; Leuner & Gould, 2009; Ming & Song, 2011; Taverna et al., 2014; Park et al., 2022). La generació i acumulació dels IPCs per sobre de la VZ desemboca en una segona zona germinal, la SVZ (Attardo et al., 2008; Noctor et al., 2004; Ortega et al., 2017). L'expansió d'aquesta àrea es creu que està relacionada amb l'expansió evolutiva del còrtex. Les neurones corticals de projecció es generen de manera seqüencial a partir de les RGCs i els IPCs (Agirman et al., 2017; Attardo et al., 2008; Borrell & Reillo, 2012; Florio & Huttner, 2014; Noctor et al., 2004; Paridaen & Huttner, 2014; Ruan et al., 2021). De fet, entre un

10 i un 20% de les neurones piramidals corticals es generen per divisió asimètrica de les RGCs, mentre que la resta ho fan per divisions simètriques neurogèniques dels IPCs (Agirman et al., 2017; Paridaen & Huttner, 2014; Taverna et al., 2014).



Figura 1.2. Corticogènesi.

Esquema representatiu de la formació del còrtex amb els principals tipus de NSCs i la seva progènie. Als inicis del procés, les NECs es divideixen simètricament per incrementar la població de progenitors. A continuació, té lloc la transició a RGCs que es poden dividir simètricament o asimètricament. En les divisions asimètriques generen noves neurones i IPCs. Els IPCs presenten una alta taxa de proliferació i contribueixen a generar un gran nombre de neurones en períodes curts de temps. Les neurones formades migren a través de les fibres de les RGCs. Al final del procés tenen lloc divisions simètriques consumidores que primer generen neurones i més tard cèl·lules de la glia. CP: placa cortical; IPC: progenitor intermedi; IZ: zona intermèdia; NEC: cèl·lula neuroepitelial; RGC: cèl·lula de la glia radial; SVZ: zona subventricular; VZ: zona ventricular. Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida a *Paridaen & Huttner, 2014*.

Les primeres neurones formaran les capes V-VI del còrtex i projectaran els seus axons a regions subcorticals. En canvi, les neurones produïdes en etapes tardanes poblaran les capes II-IV del còrtex i projectaran al còrtex ipsilateral o contralateral (Ruan et al., 2021). La formació de cèl·lules de la glia s'inicia durant l'embriogènesi tardana i continua en etapes postnatals, amb una baixa, però estesa producció d'astròcits i oligodendròcits per tot el NS adult (Götz & Huttner, 2005; Paridaen & Huttner, 2014; Taverna et al., 2014). En el còrtex, la supervivència de les cèl·lules depèn de l'acció de múltiples factors que actuen inhibint un programa latent d'apoptosi. Un cop s'han format, les neurones migren des de les zones de proliferació cap a les seves posicions finals on maduraran (**Figura 1.2**).

1.1.4 Formació de l'hipocamp

L'hipocamp, localitzat en la part medial del lòbul temporal, és una altra de les estructures clau per als processos cognitius. Entre les seves funcions principals destaquen la codificació i l'emmagatzematge de la memòria a llarg termini, el processament de la informació espacial i la navegació o l'aprenentatge (Lisman & Redish, 2018; Zhong et al., 2020). Presenta tres estructures clarament diferenciades: el gir dentat (DG; de dentate gyrus), el cornu Ammonis (l'hipocamp pròpiament dit; CA) i la fímbria. De la mateixa manera que el còrtex, l'hipocamp presenta una estructura laminada que s'origina durant el desenvolupament embrionari. La formació de l'hipocamp comença entorn el dia E14, en resposta als senvals emesos per un centre organitzador del telencèfal dorso-medial denominat amb el terme anglès "cortical hem". La inducció de l'hipocamp és possible gràcies a la secreció activa de molècules senval com els BMP (de Bone morphogenic protein) i Wnt, i a la manca d'expressió del factor de transcripció Lbbx2 (Moore & Iulianella, 2021; Urbán & Guillemot, 2014). Prop del centre organitzador hi ha el neuroepiteli hipocamapl (HNE: de hippocampal neuroepithelium) i el neuropetili dentat (DNE; de dentate neuroepithelium) que donaran lloc a les cèl·lules de l'hipocamp i el DG, respectivament (Urbán & Guillemot, 2014). Les neurones piramidals del cornu Ammonis es formen majoritàriament a la VZ entre els dies E10-E20 del desenvolupament (Figura 1.3). El DG es genera a partir del DNE, també conegut com a matriu primària, que esdevé clarament visible el dia E14.5 en els ratolins.

En etapes gestacionals posteriors, les cèl·lules progenitores migren fora del DNE cap a la superfície pial del còrtex medial en un procés dependent de les cèl·lules de Cajal-Retzius (Del Rio et al., 1997). Els progenitors, una població diversa de cèl·lules mare i precursors neuronals, migren des de la VZ cap a la fissura hipocampal formant una segona matriu. Paral·lelament, es desenvolupa una bastida de cèl·lules de la glia que uneix la fímbria a la superfície pial del còrtex. La bastida i les cèl·lules de Cajal-Retzius es mantenen durant el desenvolupament per ajudar a la migració i organització dels precursors dentats i neurones granulars (**Figura 1.3**). Els progenitors neurals arriben a la fissura hipocampal on s'acumulen i formen un últim centre de cèl·lules en proliferació o matriu terciària. Les cèl·lules granulars generades durant el desenvolupament del DG a partir dels precursors de les tres matrius formen la capa de cèl·lules granulars (GCL; de *granule cell layer*). La forma característica de les dues fulles del DG ve dictada per les cèl·lules de Cajal-Retzius que envolten la fissura hipocampal i la superfície pial. En les primeres etapes postnatals, la matriu terciària es converteix en l'única font de progenitors dentats i cèl·lules granulars. Durant la segona setmana postnatal, la proliferació al DG es restringeix i, finalment, es confina a la SGZ on residiran les NSCs durant l'etapa adulta (Urbán & Guillemot, 2014).



Figura 1.3. Formació de l'hipocamp.

Representació esquemàtica del telencàfal dorsal a diferents estadis del desenvolupament embrionari (E) i en el moment del naixement (P0). Els requadres mostren la magnificació de la regió de l'hipocamp. En el dia E12.5, el DNE primerenc es troba entre l'HNE i el CH, el qual produeix les cèl·lules de Cajal-Retzius (vermell). A mesura que avança el desenvolupament (E14.5), els precursors de la matriu primària localitats en la VZ (color blau clar) comencen a mirar cap a a la superfície pial del còrtex generant una matriu secundària. A la VZ del HNE, els precursors de la glia radial (taronja) donen lloc a les neurones de l'hipocamp. En el dia E17.5, es forma la fissura hipocampal mentre els precursors del DG migren i s'acumulen en aquesta regió i formen la matriu terciària. En aquest punt, les cèl·lules de la glia radial estenen les seves projeccions des del CH a la fissura hipocampal conduint la migració de les neurones cap a la CA1 i la CA3. En el moment del naixement, es comença a formar el DG. Les neurones granulars del gir (lila) apareixen primer en la fulla superior per sota de la fissura hipocampal. La migració de les cèl·lules de Cajal-Retzius fins a la superífice pial ajuda a la formació de la fulla inferior. Mentre que les cèl·lules precursores de les matrius primària i secundària acabaran desapareixent, les de la matriu terciària continuaran formant neurones durant el desenvolupament postnatal del DG. DG: gir dentat; DNE: neuroepiteli dentat; HNE: neuroepiteli hipocampal; RGC: cèl·lula de la glia radial; 1ari: matriu primària; 2a: matriu secundària; 3a: matriu terciària. Font: Elaboració pròpia a partir de la informació extreta Urbán & Guillemot, 2014.

1.2 Migració neuronal

Les neurones han de migrar fora de les zones germinals cap a les seves posicions finals per tal d'assolir la correcta citoarquitectura del cervell (Bressan & Saghatelvan, 2021; Marín et al., 2010; Nadarajah & Parnavelas, 2002). Aquesta migració pot ser "de dins a fora" o "de fora a dins" segons si les últimes neurones generades ocupen posicions més superficials o bé més properes a les zones proliferatives. En funció de la via que segueixen les neurones i de les interaccions que estableixen durant el trajecte, la migració pot ser radial, tangencial o en cadena (Buchsbaum & Cappello, 2019; Marín & Rubenstein, 2003). Els tres mecanismes no són excloents i una mateixa cèl·lula pot alternar-los en resposta a l'acció coordinada de factors cel·lulars intrínsecs i factors extracel·lulars. La migració radial és la via principal de migració utilitzada per les neurones piramidals de projecció del còrtex. En aquest tipus de migració, les neurones piramidals glutamatèrgiques segueixen una trajectòria perpendicular a la superfície guiades per la bastida de fibres de les RGCs (Marín et al., 2010; Rakic et al., 2008). En canvi, la migració tangencial és la via utilitzada per les interneurones gabaèrgiques. Aquestes cèl·lules són generades en el telencèfal ventral i es mouen en trajectòries paral·leles a la superfície del ventricle sense necessitar una bastida de suport per migrar (Marín et al., 2010). Per útlim, un exemple de migració en cadena és el mecanisme que segueixen els neuroblasts formats en la SVZ fins al bulb olfactiu en etapes postnatals i adultes (Akter et al., 2021).

A nivell cel·lular, el procés de migració s'aconsegueix a partir de l'extensió de processos líder (*leading process*) i processos cua (*trailing process*) per part de les neurones (**Figura 1.4**). Els processos líder són estructures dinàmiques que detecten les molècules senyal de l'entorn i guien a les neurones. El moviment bàsic de les neurones es coneix com a locomoció i es divideix en tres passos: extensió del procés líder, translocació del nucli o nucleoquinesi i eliminació del procés cua. El cicle es repeteix fins que la neurona arriba a la seva destinació. En alguns casos, els processos líder i cua acabaran transformant-se en els futurs axons i dendrites com, per exemple, en les neurones piramidals del còrtex. Quan la neurona arriba a la posició final té lloc la translocació somal final en la qual hi ha nucleoquinesis i remodelatge del procés cua, però no una nova extensió del procés líder (Noctor et al., 2004; Takano et al., 2015) (**Figura 1.4**).

1.2.1. La laminació del còrtex

Un dels esdeveniments de migració més ben estudiats del SNC és el que té lloc durant la formació del còrtex. Les neurones migren cap a la superfície pial i s'acumulen en una seqüència "de dins a fora" formant una estructura de sis capes. En aquest model de migració "de dins a fora", les primeres neurones generades ocuparan les capes més profundes del còrtex, mentre que les neurones més tardanes ocuparan posicions més superficials. Els esdeveniments de migració comencen amb la sortida dels neuroblasts postmitòtics de la VZ/SVZ i la formació d'una estructura transitòria anomenada preplaca (PP; de *preplate*) per part de les primeres neurones migren distàncies curtes i ho fan per translocació somal, és a dir, de manera independent a les fibres de les RGCs (**Figura 1.2**). Degut a l'acumulació de les neurones per sobre de la VZ, la translocació somal és substituïda per un mecanisme de migració en múltiples etapes.

El següent grup de neurones piramidals forma la placa cortical (CP; de cortical plate), intercalant-se en la preplaca i dividint-la en dues capes: una capa més superficial anomenada zona marginal (MZ; de marginal zone) i una capa més profunda o subplaca (SP; de subplate). La MZ conté neurones corticals de projecció i cèl·lules de Cajal-Retzius que sintetitzen i secreten la proteïna Reelina, encarregada de controlar la migració neuronal (Causeret et al., 2021; Gil-Sanz et al., 2013). Paral·lelament, entre la VZ i la SP es forma la zona intermèdia (IZ; de intermediate zone) amb els axons de les neurones primitives. Les noves neurones generades s'aniran posicionant sequencialment en la CP formant les capes II-VI del còrtex (Marín et al., 2010) a través del mecanisme de locomoció radial depenent de les RGCs (Figura 1.2). Per migrar, les neurones utilitzen les fibres esteses per les RGCs com a guia per arribar a la placa cortical (Agirman et al., 2017; Marín et al., 2010). La interacció entre les neurones i les fibres de la glia radial és mediada per CAMs. Paral·lelament, les interneurones gabaèrgiques migren en grup o individualment des del telencèfal ventral i es distribueixen de manera tangencial. En el transcurs de la migració presenten un procés líder ramificat i estableixen interaccions homotípiques o heterotípiques amb altres tipus cel·lulars (Marín et al., 2010).

Durant el trajecte migratori les neurones corticals integren els senyals derivats d'interaccions receptor-lligand. Els senyals provenen de la matriu extracel·lular i de la interacció directa o indirecta amb les cèl·lules veïnes. A més, hi ha factors difusibles com els factors de creixement, les neurotrofines, les semaforines, els slits o les netrines que controlen el moviment de les noves neurones. Un cop captats i integrats per la neurona, els senyals activen vies de senyalització diverses que contribueixen a la progressió de la migració. Una de les molècules amb un paper més destacat en la regulació de la migració és la Reelina. Es tracta d'una glicoproteïna de la matriu extracel·lular secretada inicialment per les cèl·lules de Cajal-Retzius de la MZ, i en etapes més tardanes per les interneurones gabaèrgiques. Participa en la laminació del còrtex activant la via de Dab1 (de *Disabled 1*) a través de la unió als receptors VLDR (de *Very low density lipoprotein receptor*) i ApoE32 (de *Apolipoprotein E receptor 2*). Els ratolins *reeler* amb mutacions en el gen de *Reln* mostren distonia, atàxia i tremolors deguts als defectes estructurals del còrtex, l'hipocamp i el cerebel (D'Arcangelo et al., 1995; González-Billault et al., 2005; N et al., 2008; Vilchez-Acosta et al., 2022).

1.2.2. La migració a l'hipocamp

En el cas de l'hipocamp, les neurones formades es converteixen en cèl·lules postmitòtiques multipolars en sortir de la VZ i arribar a la IZ. Aquestes neurones adquireixen una morfologia bipolar i migren radialment cap a la superfície pial fins a la placa hipocampal o futur estrat piramidal (Hayashi et al., 2015). Les neurones emeten processos líder que es retrauen i s'estenen generant una migració coneguda amb el terme anglès de "*climbing migration*", no dependent de les fibres de les RGCs. Les cèl·lules de Cajal Retzius i la Reelina també contribueixen a la correcta migració de les neurones piramidals i a la laminació de l'hipocamp (Hayashi et al., 2015) (**Figura 1.3**).

Les neurones, un cop han migrat i s'han diferenciat, maduren i estableixen connexions sinàptiques que construeixen el conegut circuit trisinàptic de l'hipocamp (Figura 1.3). L'activitat del circuit participa en la producció de memòries episòdiques i s'origina en el còrtex entorrinal (EC, d'*enthorrinal cortex*) (Osanai et al., 2023). Els axons de les neurones de l'EC projecten als segments dendrítics distals de les cèl·lules granulars del DG a través de la via perforant medial i lateral. Les cèl·lules granulars del DG connecten amb les neurones piramidals de la CA3 generant un feix d'axons conegut com a fibres molsoses. Els axons de les neurones de la CA1 a través de les projeccions col·laterals de Schaffer, ipsilaterals i contralaterals, i envien la informació de tornada al EC a través del subículum (Osanai et al., 2023).

1.3 Diferenciació neuronal

El procés de diferenciació de les neurones s'inicia amb l'establiment de la polaritat neuronal durant el procés de migració. Un cop les neurones arriben a la seva posició, la diferenciació continua amb la formació i maduració dels compartiments axo-dendrítics.

1.3.1. Establiment de la polaritat neuronal

Les neurones són cèl·lules altament polaritzades a nivell morfològic i funcional. El trencament de la seva simetria en resposta a estímuls intrínsecs i extrínsecs és vital per a un correcte desenvolupament i funcionament del SNC (Barnes & Polleux, 2009; Takano et al., 2019). Fruit del fenomen de polarització, les neurones presenten dos compartiments amb característiques estructurals, funcionals i morfològiques clarament diferenciades: els axons i les dendrites. L'axó és una prolongació llarga i estreta, a través del qual es transporten les vesícules sinàptiques amb els neurotransmissors que permeten la comunicació entre neurones en resposta a senyals elèctrics. Les dendrites, en canvi, són prolongacions curtes amb múltiples ramificacions on es troben els receptors de neurotransmissors que permeten captar els senyals alliberats pels axons d'altres neurones.

Els primers estudis que van intentar desxifrar els mecanismes responsables de l'establiment de la polaritat neuronal s'iniciaren a finals del s. XX de la mà de Banker (Dotti & Banker, 1987; Takano et al., 2015) en neurones hipocampals en cultiu. Els esdeveniments que transcorren al llarg de la polarització van ser dividits en cinc estadis denominats estadis de Banker (Figura 1.4, panell superior). En un primer moment, les cèl·lules dissociades del teixit i plantades en superfícies adherents presenten una morfologia arrodonida. En poques hores, comencen a estendre fil·lopodis per tot el cos cel·lular (Estadi 1). Aquests fil·lopodis esdevenen prolongacions menors o neurites immadures que s'estenen i retrauen de manera repetida (Estadi 2). Un dia després de ser plantades, una de les neurites comença a elongar-se ràpidament donant lloc a l'axó (Estadi 3). L'especificació de l'axó es considera el punt de partida de la polarització neuronal i està regulada per diferents molècules de senvalització que provoquen canvis en el citoesquelet i en el tràfic de proteïnes (Arimura & Kaibuchi, 2007). Les neurites restants continuen els cicles de creixement i retracció fins a convertir-se en dendrites al cap d'entre quatre-set dies (Estadi 4). Finalment, les estructures maduren, es construeixen les espines dendrítiques i s'inicia la sinaptogènesi (Estadi 5). La formació de les espines dendrítiques s'inicia després del setè dia en cultiu i l'establiment de les connexions sinàptiques s'observa entre els dies 14 i 21 (Takano et al., 2015).



POLARITZACIÓ IN VITRO



Esquema representatiu del procés d'establiment de la polaritat neuronal en models *in vivo* i *in vitro*. En el panell superior, s'exemplifica el procés de polarització que té lloc durant la migració de les neurones corticals. Un cop formades, les neurones abondonen la VZ i comencen a estendre múltiples dendrites i donen lloc a les cèl·lules multipolars. En la IZ es dona la transició cap a cèl·lula bipolar amb la formació de dos processos: un procés líder (futura dendrita) i un procés cua (futur axó). Les cèl·lules bipolars migraran a través de la bastida de la glia radial fins a les seves posicions finals on acabaran d'estendre l'axó i formaran l'arbre dendrític. En el panell inferior, s'observa el procés de polarització de les neurones en cultiu seguint els cinc estadis de Banker. CP: placa cortical; IZ: zona intermèdia; SVZ: zona subventricular; VZ: zona ventricular. Font: elaboració pròpia a partir de la informació extreta a *Namba et al., 2015*.

Malgrat que l'ús de cultius neuronals ha estat àmpliament utilitzat per estudiar el procés, no necessàriament reprodueix amb exactitud el fenomen *in vivo*, ja que, les neurones utilitzades en els cultius estaven prèviament diferenciades en l'hipocamp del ratolí. Per això, cal aprofundir en el coneixement dels mecanismes i regulació de la polarització *in vivo*. Avui dia, es creu que la polaritat de les neurones *in vivo*

pot ser adquirida per herència o bé establerta un cop la neurona ja s'ha format. Per exemple, les cèl·lules ganglionars de la retina hereten la polaritat de les cèl·lules neuroepitelials retinals (Barnes & Polleux, 2009). En el còrtex, les NECs i les RGCs també tenen polaritat, però els IPCs la perden en desenganxar-se de les superfícies apical i basal (Agirman et al., 2017; Bedogni & Hevner, 2021; Hevner, 2019; Noctor et al., 2004). Donat que els IPCs contribueixen a generar part de les neurones corticals, aquestes cèl·lules no poden heretar la polaritat dels seus progenitors sinó que l'han d'establir durant el procés de diferenciació (**Figura 1.4**, panell inferior). La implementació de la polaritat durant la diferenciació també s'observa en les neurones de l'hipocamp i el cerebel (Noctor et al., 2004; Takano et al., 2015).

D'entrada, les noves neurones que han migrat des de la VZ fins a la IZ estenen múltiples neurites i originen unes cèl·lules amb morfologia multipolar (MP; de multipolar) (Funahashi et al., 2014; Sakakibara & Hatanaka, 2015). Una de les múltiples neurites comença a créixer ràpidament esdevenint el procés cua que serà el futur axó. Una altra de les neurites es conveteix en el procés líder i esdevindrà la futura dendrita (Namba et al., 2014). Les neurites restants es retrauen i la cèl·lula multipolar es converteix en cèl·lula bipolar (BP; de bipolar). Aquesta transició és un dels punts crítics de la polarització in vivo. Les BP ja polaritzades deixen enrere la IZ i migren a través de la placa cortical fins a la seva posició final (Funahashi et al., 2014; Takano et al., 2015). El mecanisme exacte d'especificació de l'axó no es coneix amb certesa. Algunes hipòtesis apunten a un model de "Touchergo" en el qual quan una de les neurites de les cèl·lules MP entra en contacte amb els axons de les noves neurones. La interacció amb aquests axons pioners promou el creixement ràpid de la neurita i condueix a l'especificació de l'axó. A banda, cal esmentar que, en un 30% dels casos, les cèl·lules MP estenen en un primer lloc el procés líder i en un segon lloc el procés cua (Namba et al., 2014); i, en un 10% dels casos, ambdós processos es formen simultàniament.

1.3.2. Regulació de la polarització neuronal

L'establiment de la polaritat és un procés altament complex que depèn de la combinació de múltiples factors intrínsecs i extrínsecs. Entre els factors que hi participen, trobem factors secretables com les neurotrofines, les semaforines, el Wnt, el TGF β o el Factor de creixement depenent d'insulina 1 (IGF-1; de *Insulin growth factor 1*). També hi ha components de la matriu extracel·lular com la laminina o les CAMs (Namba et al., 2014). L'acció dels factors desencadena diverses cascades de senyalització intracel·lular que de manera coordinada modifiquen el transport de proteïnes dins la cèl·lula i, sobretot, la morfologia cel·lular a través de la reorganització del citoesquelet d'actina i tubulina (Burute et al., 2022; Schelski & Bradke, 2017; Takano et al., 2015, 2019).

Els estudis realitzats en els darrers anys han constatat la implicació de múltiples i complexes vies de senyalització en la regulació de la polaritat (**Figura 1.5**), les més rellevants es descriuen a continuació.

Via de l'AMP cíclic. Les neurotrofines com el Factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF; de Brain derived neurotrophic factor) o la Neurotrofina-3 (NT-3; de Neurotrophin-3) regulen l'especificació de l'axó a través de la via de l'AMPc (de Cyclic adenosine monophosphate). La unió del BDNF als receptors tirosina quinasa TrKB augmenta els nivells d'AMPc. Els nivells elevats d'AMPc condueixen a la fosforilació i activació de la serina/treonina quinasa LKB1 (de Liver kinase B1) per part de la Proteïna quinasa A (PKA, de Protein kinase A). L'activació de la LKB1 regula de manera indirecta proteïnes associades al citoesquelet de tubulina com la Tau o la Doblecortina (DCX; de Doublecortin) (Gu et al., 2023; Takano et al., 2019). La sobreexpressió de la LKB1 indueix la formació de l'axó, però no en la migració neuronal. La PKA també indueix la secreció de BDNF i el transport de TrkB a través de la Quinesina 1 creant una retroalimentació positiva en la neurita que esdevindrà axó (Takano et al., 2019).



Figura 1.5. Vies de senyalització en la polarització neuronal.

Representació esquemàtica de les vies de senyalització que regulen l'establiment i manteniment de la polaritat neuronal. Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida a *Namba 2015 i Schelski & Bradke, 2017*.

Via de Ras. En resposta a les neurotrofines, Ras activa la Fosfoinositol 3 quinasa (PI3K; de *Phospoinositol 3 kinase*), fet que estimula la producció de fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfat (PIP3). Els nivells de PIP3 activen de manera indirecta la Proteïna quinasa B (PKB; de *protein kinase B*) que fosforil·la i inactiva a la Quinasa sintetitzadora de glicogen 3 β (GSK3 β , de *Glycogen synthase kinase 3\beta*). La inactivació de la GSK3 β activa Proteïnes associades a microtúbuls (MAPs, de *microtubul-associated proteins*) com la Tau o la Proteïna mediadora de la resposta a col·lapsina 2 (CRMP2, de *Col·lapsin response mediator protein 2*) provocant l'estabilització dels microtúbuls. En cultius, nivells alts de CRMP2 provoquen la inducció de múltiples axons mentre que la seva inhibició n'impedeix la formació. *In vivo*, el silenciament de l'expressió de CRMP2 afecta a la migració i a la transició de MP-BP (Takano et al. 2015; Shi et al. 2003; Ménager et al. 2004).

Via de les Rho GTPases. La família de les Rho GPTases com la RhoA, Cdc42 o Rac1 són alguns dels reguladors principals de la dinàmica del citoesquelet. Els receptors de neurotrofines TrkB activen la via de Rac1 a través de Tiam1 que indueix l'especificació de l'axó a través de Shootin1 (Namba et al., 2015; Takano et al., 2019). Una altra de les GTPases, Cdc42 és activada per la PI3K i el complex PAR que està format per PAR3 (de *Partioning defective protein 3*), PAR6 (de *Partioning defective protein 6*) i la Proteïna quinasa atípica C (aPKC; de *Atypical protein kinase C*). El complex PAR activa Rac1 el qual activa de nou la PI3K i Shootin1 generant també un circuit de retroalimentació positiva (Arimura & Kaibuchi, 2007; Barnes & Polleux, 2009; Lewis et al., 2013; Takano et al., 2019).

Via de la CaMK i la senyalització per calci: la NT-3 pot estimular l'alliberament de calci depenent de incrementant els seus nivells a l'extrem dels nous axons. Això promou l'activació de la via de la Proteïna quinasa depenent de calci/calmodulina I (CaMKI; de *Calcium/calmoduline-dependent protein kinase I*) (Namba et al., 2015). La CaMKI indueix la fosforil·lació i activació de RhoA i la quinasa de RhoA, ROCK (de *Rho activated kinase*). Aquestes molècules regulen el citoesquelet d'actina a través de diferents vies. D'aquesta manera, la via és important per l'especificació de l'axó i la transició de MP a BP. En les neurites no polaritzades, aquesta via experimenta fenòmens de retroalimentació negativa que reprimeixen la retroalimentació positiva de les vies que afavoreixen la formació de l'axó. D'aquesta manera, s'evita la formació de múltiples axons i s'especifiquen les dendrites (Takano et al., 2019).

Tal com s'ha vist, les vies presenten fenòmens de retroalimentació positiva o negativa que afavoreixen l'establiment de la polaritat de les neurites. En la neurita que esdevindrà axó, els bucles de retroalimentació positiva faciliten la formació de l'axó. A més, des d'aquesta prolongació, es progaguen senyals de retroalimentació negativa cap a la resta de neurites per inhibir la formació de múltiples axons (**Figura 1.6**) (Takano et al., 2019).



Figura 1.6. Retroalimentació positiva i negativa en les neurites.

En les neurites en desenvolupament s'observen bucles de retroalimentació positiva i negativa que afavoreixen la polarització neuronal. Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida a *Namba 2015 i Schelski & Bradke, 2017*.

1.3.3. El paper del citoesquelet

La majoria de vies de senyalització descrites condueixen, en últim terme, a la remodelació del citoesquelet. L'actina, la tubulina i els neurofilaments són components principals dels compartiments axo-dendrítiques amb funcions destaques en l'establiment i manteniment de la polaritat neuronal. Tot això és possible gràcies a les seves característiques estructurals i funcionals. Els filaments d'actina i els microtúbuls presenten polaritat intrínseca i tenen la capacitat de convertir els senyals moleculars en canvis estructurals, modificant així la morfologia de la cèl·lula. Aquests dos factors converteixen el citoesquelet en el motor principal de l'establiment i el manteniment de la polaritat neuronal (Takano et al., 2019; Witte et al., 2008).

L'establiment inicial de la polaritat és altament dependent de la dinàmica del citoesquelet de tubulina. Els microtúbuls són polímers formats pels heterodímers d' α i β -tubulina, la polimerització dels quals forma protofilaments que s'uneixen per construir una estructura tubular (Higgs & Das, 2022). Els fenòmens de polimerització/despolimerització tenen lloc als extrems dels microtúbuls.



Figura 1.7. Dinàmica del citoesquelet en la polaritat neuronal.

Esquema representatiu on es mostren les estructures del citoesquelet en el procés de polarització de les neurones. Els dos compartiments, axons i dendrites, presenten diferents dinàmiques del citoesquelet d'actina i tubulina. Hi ha diversos mecanismes involucrats en el manteniment de la polaritat: l'estrucura i l'organització del citoesquelet; així com, el transport de molècules. El fragment inicial de l'axó (AIS; ombrejat en color lila) és clau pel manteniment de la polaritat. Font: elaboració pròpia a partir de la informació extreta a *Namba et al., 2015; Schelski & Bradke, 2017.*

L'orientació de les subunitats dels heterodímers, amb l'a-tubulina exposada a l'extrem negatiu i la \beta-tubulina al positiu, doten a l'estructura tubular d'una polaritat intrínseca que facilita el transport de proteïnes a través dels microtúbuls (Higgs & Das, 2022; Stiess & Bradke, 2011). De fet, aquesta polaritat és clau per a l'especificació de l'axó i permet diferenciar els compartiments dendrítics i axonals. Les neurites són estructures caracteritzades per la presència de microtúbuls amb polaritat mixta (Witte et al., 2008). Durant l'especificació de l'axó, un canvi en la polaritat fa que els microtúbuls de la neurita que esdevindrà axó acabin orientats en una mateixa direcció amb l'extrem positiu cap a la vessant distal (Figura 1.7). La polaritat mixta, en canvi, es manté en les neurites que es convertiran en dendrites. Els mecanismes funcionals que fan possible la polarització i formació de l'axó es basen en els esdeveniments de polimerització/despolimerització dels microtúbuls. Els microtúbuls exhibeixen una inestabilitat dinàmica en la qual es poden donar períodes de creixement lent i constricció ràpida que permeten la reorganització de l'estructura (Higgs & Das, 2022). El canvi de polimerització a despolimerització depèn de la subunitat ß i la seva unió a GTP o GDP. L'estabilitat dels feixos de microtúbuls constitueix una altra diferència entre axons i dendrites. Els microtúbuls de l'axó són més estables que els de les dendrites, i de fet, la inducció de l'estabilització dels feixos de microtúbuls a través de substàncies, com el taxol, és suficient per induir la formació de l'axó (Namba et al., 2015; Schelski & Bradke, 2017; Witte et al., 2008). En conjunt, la dinàmica del citoesquelet està regulada per MAPs i altres efectors cel·lulars, i és altament dependent de modificacions postraduccionals com l'acetilació (Janke & Bulinski, 2011). Els canvis en el citoesquelet de tubulina, així com el transport de càrrega a través dels seus feixos, fan possible la polarització neuronal i el creixement axonal.

Un segon membre del citoesquelet clau en la polarització neuronal és l'actina (Figura 1.7). Els filaments d'actina (F-actina) estan formats per monòmers d'actina globular (G-actina). El creixement d'aquests filaments és dona per la incorporació de monòmers en qualsevol dels seus extrems. La incorporació, però, és més ràpida en un dels dos extrems fet que origina estructures polaritzades, com en el cas de la tubulina. L'ATP és necessària per a la polimerització, els monòmers d'actina es troben inicialment units a ATP, i aquesta és hidrolitzada a ADP després de la unió dels monòmers als filaments. Els fenòmens de polimerització i despolimerització de l'actina en resposta a la senvalització cel·lular contribueixen a la polarització neuronal i a la dinàmica diferencial dels cons de creixement. En el con de creixement del futur axó, els filaments d'actina presenten una major taxa de recanvi i estructuració, mentre que en les futures dendrites són menys dinàmics (Stiess & Bradke, 2011; Takano et al., 2015; B. Zhao et al., 2017). Aquests processos estan regulats per proteïnes associades a l'actina (ABPs, d'Actin binding proteins) que participen en la nucleació, despolimerització (o severing), ramificació i formació de feixos (Tahirovic & Bradke, 2009) regulant així l'estructura i estabilitat de les xarxes d'actina. Entre elles, hi trobem la proteïna nucleadora Arp2/3 activada per proteïnes associades a la membrana com WAVE (de WASP-family verprolin-homologous protein) o els factors despolimeritzadors ADF i cofilina. L'activitat de l'ADF/cofilina augmenta el nombre d'extrems lliures de l'actina que poden ser polimeritzats i controla les reserves de F/G-actina (Konietzny et al., 2017). A nivell funcional, aquests esdeveniments de reestructuració de l'actina, conjuntament amb el transport de substàncies a través dels filaments, permeten el manteniment de l'asimetria neuronal i contribueixen a la guia axonal i a la formació de l'arbre dendrític (Konietzny et al., 2017; Stiess & Bradke, 2011; Tahirovic & Bradke, 2009; Takano et al., 2015; B. Zhao et al., 2017). Específicament, la conservació de la polaritat és possible gràcies a l'acumulació de filaments d'actina en el segment inicial de l'axó (AIS, d'axon initial segment) originant una barrera que controla la difusió de substàncies i confina les proteïnes en els seus compartiments (Figura 1.7) (Huang & Rasband, 2018; Jones & Svitkina, 2016; Leterrier, 2018).

Els últims integrants del citoesquelet neuronal són els neurofilaments. Aquests filaments intermedis estan formats per les subunitats: NF-L (de neurofilament high), NF-M, (de neurofilament middle), NF-H (de neurofilament heavy) i α -internexina o periferina (Lee & Cleveland, 2003). Es tracta de filaments no polaritzats que proporcionen suport estructural per mantenir l'asimetria de les

neurones, encara que les seves funcions difereixen entre els dos compartiments. En les dendrites, els neurofilaments són escassos i fràgils, però en els axons són el component més abundant del citoesquelet (Yuan et al., 2017). Els filaments formen xarxes entrellaçades que es connecten amb altres components del citoesquelet per tal de crear regions especialitzades implicades en el creixement axonal i en funcions d'ancoratge en el terminal sinàptic (Sainio et al., 2022).

1.3.4. Elongació i maduració de l'axó

L'elongació i la ramificació dels axons es dona a partir del con de creixement, una estructura mòbil amb un citoesquelet altament dinàmic localitzat en l'extrem de les neurites. El con de creixement és capaç de detectar els senvals del seu entorn i dirigir l'elongació de l'axó cap a la seva diana o provocar la seva retracció. Els senvals captats pel con convergeixen en canvis en el citoesquelet d'actina i tubulina (Schelski & Bradke, 2017) (Figura 1.8). A nivell estructural, el con de creixement es pot dividir en tres dominis: el domini perifèric (P), el domini central (C) i la zona de transició (T). El domini central conté orgànuls i feixos de microtúbuls estables que entren al con de creixement provinents de l'eix de l'axó. A la zona perifèrica, trobem majoritàriament filaments d'actina dinàmics que formen fil·lopodis i lamel·lipodis i una petita proporció de microtúbuls poc estables. En la zona de transició, hi ha una zona amb arcs d'actina formada per estructures d'actomiosina generades per l'acció de la miosina. En aquesta regió, els filaments d'actina són despolimeritzats i nous monòmers d'actina globular (o G-actina) resten disponibles per ser polimeritzats de nou. Abans de la polarització morfològica, el futur axó presenta una dinàmica potenciada del con de creixement i un major recanvi d'actina (Witte et al., 2008).

La dinàmica del con de creixement durant el procés d'elongació depèn de les interaccions entre la xarxa de filaments d'actina i els microtúbuls, i es pot dividir en tres fases: protusió (1), engruiximent (2) i consolidació (3) (Dent et al., 2011; Higgs & Das, 2022).

 Protusió. L'acumulació de filaments d'actina permet l'extensió ràpida de fil·lopodis i lamel·lipodis. Els cons de creixement exploren l'entorn i contacten amb les cèl·lules veïnes, i la matriu extracel·lular fent possible el moviment (Higgs & Das, 2022; Stoeckli, 2018). La interacció dels receptors de la membrana del con de creixement amb els seus lligands activa vies de senyalització que reestructuren i polimeritzen els filaments d'actina dels fil·lopodis i els lamel·lipodis. Les proteïnes que regulen la nucleació, la ramificació i l'elongació dels filaments d'actina, com el complex Arp2/3 (d'*Actin related protein 2/3 complex*) o Ena/VASP, són importants per aquesta etapa (Suter & Miller, 2011).

- 2. Engruiximent. Els microtúbuls entren al domini central aprofitant el flux retrògrat atenuat de la F-actina (Sánchez-Huertas & Herrera, 2021). El transport de components a través d'aquests microtúbuls permet l'entrada d'orgànuls i vesícules a la zona perifèria del con de creixement (Dent et al., 2011; Sánchez-Huertas & Herrera, 2021). Els neurofilaments també s'integren a l'estructura del con en aquesta etapa.
- **3. Consolidació.** La part proximal del con de creixement es contrau i estabilitza formant l'estructura cilíndrica central característica de l'axó. Els filaments d'actina es despolimeritzen en el coll del con de creixement i permeten que la membrana es faci més estreta entorn el feix de microtúbuls. Seguidament, els microtúbuls de l'interior de l'estructura s'estabilitzen. (Dent et al., 2011; Higgs & Das, 2022).

En conjunt, l'elongació i la ramificació de l'axó requereix de síntesi proteica, remodelació del citoesquelet i transport de vesícules a la part distal de l'axó (E. Dent et al., 2011; Gamarra et al., 2021). Un cop l'axó arriba a la seva diana, inicia el procés de ramificació per tal de contactar amb diverses dianes postsinàptiques (Dent et al., 2011; Sarnat, 2022).



Figura 1.8. L'estructura del con de creixement i l'elongació de l'axó.

Representació del procés d'elongació i ramificació de l'axó (panell esquerra). Aquest procés depèn del con de creixement, una estructura altament dinàmica formada per filaments d'actina i microtúbuls (panell dret). El con de creixement consta d'una regió perifèrica rica en una xarxa de microfilaments, una regió de transició on hi trobem arcs d'actina i una regió central amb microtúbuls. A partir de senyals químics atraients i repel·lents, el con dirigeix l'elongació de l'axó. Per a la formació de les ramificacions (panell inferior esquerra) l'actina s'acumula formant un fil·lopodi o lamel·lipodi que es posteriorment estabilitzat

pels microtúbuls. A continuació, es formarà un con de creixement en la ramificació que permetrà la seva elongació. Les estructures formades seran estabilitzades o refinades en un procés regulat per molècules senyal i l'activitat sinàptica (panell inferior central). Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida de *Lewis et al 2013*.

1.3.5. Formació i maduració de l'arbre dendrític

El creixement i la ramificació de les dendrites determina les connexions i els estímuls que la neurona rebrà i processarà. La formació de l'arbre dendrític és un procés dinàmic i complex que engloba el creixement i la morfogènesi de les dendrites; així com la seva retracció i refinament (Arikkath, 2012; S. Lewis, 2011; Puram et al., 2011; Richards et al., 2020). La diferenciació dels compartiments dendrítics té lloc, generalment, després de l'especificació de l'axó, ja que la morfogènesi de les dendrites no és compatible amb el procés de migració. De fet, hi ha senvals que faciliten la migració com la N-cadherina, Sox2 o la Semaforina 3 que inhibeixen el creixement de les dendrites (Prigge & Kay, 2018). L'extensió de les dendrites té lloc quan la neurona arriba a la seva destinació final on el procés cua es converteix en les dendrites basals primàries. Els senvals locals de la matriu extracel·lular i els contactes establerts amb dendrites de neurones veïnes, de la pròpia neurona o de cèl·lules de la glia promouen canvis en el citoesquelet que ajuden a la construcció de l'arbre dendrític amb uns patrons determinats. Per garantir la correcta funció neuronal i la connectivitat del sistema, els patrons dendrítics han d'estar controlats de manera específica i s'han de coordinar amb l'activitat sinàtpica (Ledda & Paratcha, 2017). Entre els factors que regulen el procés hi trobem senvals difusibles com les neurotrofines, els BMPs, els factors neurotròfics, les semaforines o les CAMs (Kirchner et al., 2023; Ledda & Paratcha, 2017). A nivell intracel·lular, la senvalització per calci, estimulada per l'activitat neuronal, o els canvis en la transcripció i traducció de gens específics, també controlen la formació de les dendrites (Konietzny et al., 2017). En conjunt, aquests factors poden modificar l'estructura del citoesquelet a través de proteïnes ABP com les proteïnes nucleadores Ena/VASP o Arp2/3 que regulen l'extensió de l'actina dels fil·lopodis necessària per a la formació de les ramificacions.

Per minimitzar la redundàcia i optimitzar la innervació de les diferents regions, s'estableixen uns patrons específics que asseguren un sol·lapament mínim entre els arbres dendrítics de neurones veïnes amb funcions similars, en un procés conegut amb el terme anglès de *tiling*. Per això, és important el fenomen de repulsió entre neurites d'una mateixa neurona denominat *self-avoidance* (Arikkath, 2012; Grueber & Sagasti, 2010). Un cop construïda l'arquitectura de l'arbre dendrític, les dendrites maduren i comencen a formar unes protusions en la seva membrana, anomenades espines dendrítiques, on resideixen la majoria de sinapsis excitatòries.

Les dendrites d'una mateixa neurona podran rebre sinapsis de diferent tipus i esdevenir molecularment i funcionalment diferents (Prigge & Kay, 2018). Finalment, es refinen les estructures per assegurar que només aquelles dendrites correctament innervades perdurin (Ledda & Paratcha, 2017; Puram & Bonni, 2013). La retracció de les dendrites sembla estar regulada per difernts mecanismes, entre els quals hi ha la Calci/calmodulina kinase II β (CaMKII β ; de Calcium/calmoduline kinase II β) (Nicole & Pacary, 2020; Puram et al., 2011).

1.4 Sinaptogènesi

La construcció de la intricada arquitectura del sistema nerviós finalitza amb l'establiment de connexions entre neurones o sinapsis. Les sinapsis es defineixen com a connexions asimètriques especialitzades que permeten la transferència controlada d'un senyal químic o elèctric entre una neurona presinàptica i una diana postsinàptica (Südhof, 2018; Sanes and Zipursky 2020; Lim et al., 2022). La majoria de sinapsis del sistema nerviós són químiques i es poden dividir en excitatòries o inhibitòries segons el tipus de neurotransmissor que alliberi la neurona presinàptica, i la resposta que es desencadeni en la neurona postsinàptica. El neurotransmissor principal de les sinapsis excitatòries és el glutamat i el de les inhibitòries, l'Àcid gamma-aminobutíric (GABA; de *Gamma-aminobutyric acid*).

Les sinapsis estan formades per dominis especialitzats: la zona activa i la densitat postsinàptica (PSD; de postsynaptic density). El botó sinàptic de l'extrem dels axons conté vesícules sinàptiques amb neurotransmissors. Quan un potencial d'acció despolaritza el botó, provoca l'alliberament de les vesícules a la fenedura sinàptica. Les vesícules es fusionen en la zona activa del terminal presinàptic, una regió composta d'una complexa xarxa proteica (Südhof, 2018, 2012). Els components principals del complex proteic presinàptic són les proteïnes RIM, Munc13, RIM-BP, α -liprina i ELKS. Aquestes proteïnes s'acoblen a les vesícules sinàptiques, recluten canals de calci i posicionen correctament la zona activa enfront de les especialitzacions postsinàptiques (Südhof, 2012; Emperador-Melero and Kaeser, 2020; Böhme 2019). En línia amb la zona activa, però en la neurona postsinàptica, hi ha la PSD. Aquesta regió electrònicament densa en imatges de microscòpia electrònica també està formada per una xarxa de proteïnes. La PSD permet l'agrupament dels receptors de neurotransmissors postsinàptics, els canals iònics dependents de voltatge i les molècules senval (Dosemeci et al., 2016; Südhof, 2018; Zeng et al., 2018). En la majoria de sinapsis excitatòries, la PSD es troba en les espines dendrítiques (Runge et al., 2020).

La formació de les sinapsis s'inicia en etapes embrionàries, però continua en les primeres setmanes postnatals i, en menor grau, en l'etapa adulta. Després del procés de diferenciació, les neurones activen gens que codifiquen per proteïnes

sinàptiques i s'observa, en les neurones implicades, la formació, l'acumulació i el tràfic de vesícules amb components pre i postsinàptics (Südhof, 2021). Hi ha diferents molècules senyals i factors que preparen a les neurones per a l'establiment de les sinapsis, per exemple, afavorint la seva diferenciació i maduració per tal que siguin competents. Les neurotrofines promouen la maduració neuronal i l'arborització dendrítica, mentre que membres de la família de Wnt o el FGF afavoreixen la ramifiació dels axons i l'acumulació de vesícules sinàptiques (Südhof, 2021). També hi ha factors que contribueixen a crear un entorn permissiu on el contacte entre l'axó i la dendrita per formar la sinapsis pugui tenir lloc. Les neurones competents estableixen els contactes seguint una seqüència d'esdeveniments que es pot dividir en tres etapes: la guia axonal (1), l'especificació sinàptica (2) i l'assemblatge de les sinapsis (3) (Sanes & Zipursky, 2020) (**Figura 1.9**, panell esquerra).

- 1. Guia axonal. Els axons poden recórrer llargues distàncies fins a la seva diana guiats per molècules senyal atraients o repel·lents que són reconegudes pels receptors del con de creixement (Stoeckli, 2018; Zang et al., 2021). Les molècules senyal provenen de zones llunyanes a l'axó si són difusibles o bé, des de zones properes, si es troben en la matriu extracel·lular o la superfície de les cèl·lules. Un cop arriben a la diana, els axons es ramifiquen i emeten fil·lopodis per tal d'establir els primers contactes amb la neurona postsinàptica.
- 2. Especificitat sinàptica. Un cop els axons arriben a la diana es produeix el reconeixement entre les membranes pre i postsinàptiques. A continuació, s'observa l'establiment inicial de contactes, sovint transitoris, mediat per les unions heterofíliques entre CAMs. Alguns exemples de CAMs necessàries per l'establiment de les sinapsis són les cadherines, la NCAM1, les SynCAMs o les neuroligines/neurexines (Honig & Shapiro, 2020; Sanes & Zipursky, 2020; Shapiro et al., 2007). En la majoria dels casos, primer té lloc l'especificació presinàptica i després la postsinàptica.
- **3.** Assemblatge de la sinapsi. Un cop ha tingut lloc la inducció de les sinapsis, s'han de construir els compartiments pre i postsinàptics; fet que implica la síntesi de diferents proteïnes, el transport de les molècules sinàptiques i la reorganització del citoesquelet (Südhof, 2018).



Figura 1.9 Formació de les connexions sinàptiques.

Esquema representatiu del procés de formació i refinament de les sinapsis. A la dreta es mostren les etapes de formació de les sinapsis. El panell de l'esquerra mostra el refinament de les connexions que té lloc durant les etapes postnatals. Les espines s'estabilitzen entorn al dia postnatal 60 (P60), tot i que en etapes adultes també poden patir processos de formació i eliminació. Font: elaboració pròpia a partir de la informació de *Waites et al., 2005.*

Les diferents etapes de la formació de les sinapsis estan regulades per múltiples factors entre els quals hi ha elements de la matriu extracel·lular o molècules senval. Les molècules solubles poden ser alliberades per les cèl·lules diana (p. ex: netrines, semaforines, Efrina A, Wnt, FGF) o per les cèl·lules de la glia (p. ex.: ApoE, Trombospondina-1 o TSP1) (Südhof, 2018). A més, el paper destacat de les cèl·lules de la glia en la formació i el manteniment de les sinapsis fa que sovint les sinapsis siguin denomidades amb el terme de sinapsis tripartides. Entre tots els factors que controlen la connectivitat sinàptica, les CAMs tenen un rol protagonista que es detallarà en el Capítol 3. La densitat sinàptica augmenta ràpidament des del naixement i arriba al seu màxim entre el primer i segon any de vida en humans (Südhof, 2018). Durant l'adolescència, el nombre de sinapsis formades comença a caure dràsticament, però s'estabilitza en l'etapa adulta (Figura 1.9, panell dret). Així doncs, durant la infância es produeixen de manera massiva connexions sinàptiques que posteriorment són eliminades en el que es coneix com a refinament o "prunning" sinàptic. El refinament selectiu després d'una formació excessiva de connexions optimitza els circuits neuronals i fa que les xarxes siguin més robustes i eficients (Navlakha et al., 2015; Sakai, 2020).

Durant el refinament, les sinapsis que es mantindran es seleccionen en funció de l'activitat sinàptica. D'aquesta manera les sinapsis amb una major activitat seran potenciades i retingudes. Contràriament, les sinapsis amb menor activitat seran debilitades i finalment eliminades fet que permet la redistribució dels recursos. Les cèl·lules del sistema immunitari residents en el NS, la micròglia, adopten un rol

actiu en el refinament de les sinapsis (Paolicelli et al., 2011). Les cèl·lules de la micròglia, guiades per molècules com CX3CL1 o proteïnes del complement (Schafer et al., 2012; Stevens et al., 2007) poden exercir una fagocitosi parcial selectiva o trogocitosis de les estructures sinàptiques i induir la formació de fil·lopodis en l'espina postsinàptica (Weinhard et al., 2018).

Capítol 2. Plasticitat neuronal

La plasticitat neuronal és la sorprenent capacitat de modificar els circuits neuronals en resposta a l'experiència (Leuner & Gould, 2009). Hi ha dos mecanismes principals de plasticitat neuronal en el cervell adult: la plasticitat sinàptica i la neurogènesi adulta. Mentre que la plasticitat sinàptica engloba els canvis que es donen en les connexions entre neurones, la neurogènesi adulta fa referència a la generació de noves neurones i a la seva incorporació en els circuits preexistents. Aquests dos instruments tenen un pes determinant en processos com l'aprenentatge o la memòria. Anomalies en el seu correcte funcionament es troben en la base de diversos desordres neurològics (Magee & Grienberger, 2020).

2.1 Plasticitat sinàptica

El concepte plasticitat sinàptica fa referència als canvis en l'eficàcia sinàptica dependents de l'activitat. L'activitat pot incrementar o disminuir la força de les connexions tot regulant la maquinària sinàptica de les neurones. El terme fou donat a conèixer per Santiago Ramón y Cajal, un dels primers investigadors en explorar les capacitats plàstiques del SNC (Stahnisch & Nitsch, 2002). La durada dels canvis en les connexions sinàptiques permet classificar la plasticitat en dos tipus: la plasticitat a curt termini i la plasticitat a llarg termini. En la plasticitat a curt termini, els canvis en les sinapsis tenen una durada de mil·lèsimes de segon a minuts i sovint impliquen modificacions postraduccionals però no canvis en la síntesi local de proteïnes. En canvi, en la plasticitat a llarg termini, els canvis es poden mantenir d'hores a anys i, precisament per aquest motiu, se'l considera el principal mecanisme responsable de l'emmagatzematge dels records i les experiències. Les modificacions induïdes per la plasticitat a llarg termini requereixen d'alteracions majors en la dinàmica de la cèl·lula, com per exemple, la síntesi local de proteïnes (Holt et al., 2019; Rangaraju et al., 2017).

Els mecanismes que permeten traduir les experiències viscudes en canvis permanents en els circuits neuronals han estat àmpliment estudiats en els darrers anys. Una de les primeres idees sorgides per respondre aquest interrogant fou la teoria de la plasticitat Hebbiana postulada per Donald Hebb l'any 1949. Hebb proposava que l'activitat simultània entre dues o més neurones augmenta la força de la seva connexió. En paraules de Siegrid Löwels, "*cells that fire together, wire together*". Malgrat moltes de les formes de plasticitat sinàptica que coneixem en l'actualitat es correlacionen amb la plasticitat Hebbiana, hi ha mecanismes de plasticitat a llarg termini que no ho fan (p. ex.: quan la plasticitat a llarg termini és emmagatzemada i expressada únicament per la neurona presinàptica) (Magee & Grienberger, 2020).

Els mecanismes de plasticitat sinàptica que prevalen avui dia foren descoberts a l'hipocamp. En base als estudis realitzats amb neurones hipocampals, i corroborats en altres regions, s'ha observat que l'activació sincrònica de les neurones pre i postsinàptiques potencia o deprimeix la força de la transmissió sinàptica de la connexió estimulada (Citri & Malenka, 2007). El fenomen rep el nom de potenciació a llarg termini (LTP; de *Long Term Potentiation*) quan augmenta la força de la connexió; o depressió a llarg termini quan la disminueix (LTD; *Long Term Depression*) (Malenka & Bear, 2004; Nicoll, 2017). Tot i que els seus efectes són oposats, una mateixa sinapsis pot experimentar LTD i LTP en resposta a diferents patrons d'activació dels receptors de glutamat.

L'estimulació sinàptica d'alta freqüència (HFS; de *high-frequency stimulation*) indueix la LTP a través d'una seqüència d'esdeveniments que es poden resumir en tres punts: l'activació dels receptors de glutamat NMDA (de *N-methyl-D-aspartate*) provoca l'entrada de calci a l'interior de la cèl·lula (1); els nivells augmentats de calci activen de manera transitòria la CaMKII (2); i l'activació de la CaMKII desencadena cascades de senyalització que porten a la incorporació de receptors de glutamat AMPA (de *a-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) addicionals i a la remodelació de les estructures postsinàptiques a partir de canvis en el citoesquelet (3) (Castillo et al., 2012; Colgan & Yasuda, 2014).

El fenomen oposat a la LTP és la LTD que pot ser induïda a través de períodes d'estimulació de baixa freqüència prolongats (LFS; de *Low-Frequency Stimulation*), la combinació d'estimulació basal i despolarització, potencials d'acció de retropropagació (forma dependent del temps d'ocurrència dels polsos, STDP; de *Spike-Time Dependent Plasticity*) o bé per l'aplicació d'agonistes. Aquests estímuls activen els receptors de glutamat NMDA i mGluR desencadenant vies de senyalització que impliquen sensors de calci i provoquen la inhibició de potencials d'acció (Collingridge et al., 2010).

Les dues formes de plasticitat sinàptica, LTP i LTD, solen requerir de la remodelació dels compartiments pre i postsinàptics de manera que els mecanismes de plasticitat sinàptica poden ser classificats en mecanismes presinàptics o postsinàptics (Sheng & Kim, 2002; Yang, 2013; Nicoll 2017).

2.1.1 Plasticitat presinàptica

Els esforços dedicats a entendre els canvis que es donen en les connexions sinàptiques en resposta a processos cognitius s'han focalitzat en el compartiment postsinàptic. Tot i així, els canvis en la força sinàptica poden ser deguts també a fenòmens de plasticitat presinàptica (Castillo et al., 2012; Yang & Calakos, 2013). La plasticitat a llarg termini presinàptica modifica l'eficàcia d'alliberament de neurotransmissors, augmentant-la o disminuint-la, a partir de mecanismes moleculars que inclouen RIM1α, Rab3, Munc13 o els Canals de calci dependents de voltatge (VGCC; de *Voltatge-gate calcium channels*). Aquests efectors modifiquen la probabilitat d'alliberament (Pr) regulant aspectes com la preparació de les vesícules o l'alliberament sincronitzat dels neurotransmissors (Südhof, 2004; Yang & Calakos, 2013).

Els mecanismes bàsics d'inducció de la LTP o LTD presinàptiques varien en funció de si la inducció és homosinàptica o heterosinàptica, és a dir, si la plasticitat a llarg termini és estimulada per la pròpia connexió sinàptica o per una altra sinapsis. Un exemple de mecanisme d'inducció homosinàptica és el de les fibres molsoses de la CA3 de l'hipocamp (Castillo et al., 2012; Yang & Calakos, 2013). En les fibres molsoses de la CA3, la inducció de la LTP presinàptica succeix quan hi ha una entrada de calci pels canals del terminal presinàptic acompanyada d'un potencial d'acció i flux de calci en el soma (Monday & Castillo, 2017). També requereix l'activació de TrkB i la presència de zinc vesicular. Aquestes formes de LTP són independents de NMDAR i dependents de la via de l'AMPc/PKA. Per a la inducció de la LTD és necessària l'activació dels receptors metabotròpics de glutamat mGluR2/3 en el terminal presinàptic. Aquest mecansime es troba en altres àrees com l'amígdala, el còrtex o en les fibres paral·leles del cerebel (Castillo et al., 2012). Les neurones postsinàptiques també poden instigar fenòmens de LTP o LTD en la neurona presinàptica a partir de senvals retrògrads. Les espines dendrítiques poden difondre molècules senval com l'òxid nítric que redueix l'alliberament de glutamat en les sinapsis excitatòries; tot incrementant el de GABA en les sinapsis inhibitòries (Hardingham et al., 2013).

L'estímul de la LTP també pot ser heterosinàptic a partir de molècules difusibles que viatgen fins a terminals sinàptics propers o bé a través de l'acció del glutamat provinent de sinapsis veïnes sobre els receptors de NMDA (Castillo et al., 2012; Yang & Calakos, 2013).

2.1.2 Plasticitat postsinàptica: les espines dendrítiques

Els mecanismes de plasticitat postsinàptica inclouen canvis en els receptors de neurotransmissors, modificacions en la síntesi proteica local o reorganitzacions del citoesquelet en resposta a la LTP o LTD (Sumi & Harada, 2020). En les sinapsis excitatòries, la majoria d'aquests canvis es focalitzen en les espines dendrítiques.

Les espines dendrítiques es defineixen com a protusions de la membrana de les dendrites on resideixen la majoria de sinapsis excitatòries. Ramón y Cajal fou el primer en detectar-les en cèl·lules de Purkinje tenyides amb la tinció de Golgi, i les va plasmar en les seves reconegudes il·lustracions. Es tracta d'estructures clau en la transmissió sinàptica compostes per un cap i un coll estret d'aproximadament 0,1 µm. Actuen com a compartiments postsinàptics autònoms que aïllen els senyals químics i elèctrics (Bosch & Hayashi, 2012) i són estructures clau en la transmissió sinàptica.

Atenent a la seva forma i mida, les espines es poden classificar en fil·lopodis, espines primes (o thin), espines rabassudes (o stubby) o espines amb forma de bolet (o mushrooms) (Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020; Runge et al., 2020). Els diferents tipus d'espina desenvolupen funcions específiques en el procés de formació de contactes sinàptics. Els fil·lopodis són protrusions llargues i estretes molt dinàmiques. Tenen una elevada presència en les dendrites durant les primeres etapes postnatals, però disminueixen progressivament. Se'ls considera els precursors de les espines i s'encarreguen de detectar els senvals de l'entorn i iniciar el contacte amb el terminal presinàptic (Runge et al., 2020). Un cop establerts aquests primers contactes, els fil·lopodis són progressivament substituïts per espines rabassudes. Aquestes espines tenen un cap amb diàmetre més gran i s'uneixen directament a l'espina o través de colls molt curts (Tønnesen et al., 2014). A mesura que maduren les connexions, les espines rabassudes disminueixen, i predominen les primes i en forma de bolet. Les espines en forma de bolet són les més estables i es consideren les espines funcionals connectades sinàpticament al botó sinàptic. Aquesta aparició seqüencial dels diferents tipus de dendrites suggereix que els fil·lopodis estableixen els primers contactes amb la neurona postsinàtica a partir del quals les espines madures emergeixen (Hering & Sheng, 2001). Cal apuntar, però, que l'evolució constant en la qual es troben les espines fa que la seva morfologia sigui transitòria i, per tant, la importància funcional d'aquesta classificació necessiti ser revisada (Runge et al., 2020; Tønnesen et al., 2014).

Pel que fa a la seva composició, les espines contenen subdominis especialitzats rics en proteïnes del citoesquelet i en receptors de neurotransmissors (**Figura 1.10**). Els elements principals en una espina són: **Densitat postsinàptica.** La PSD és una estructura organitzada en capes, electrònicament densa, formada per diferents proteïnes unides entre elles per interaccions domini-domini específiques. Entre les proteïnes que la conformen hi trobem receptors, proteïnes bastida que estabilitzen els receptors, molècules de transducció de senyal, canals iònics i components del citoesquelet (Sheng & Hoogenraad, 2007). La PSD-95 (de *Postsynaptic density protein 95*) és una de les proteïnes bastida necessàries per la maduració de les sinapsis glutamatèrgiques i el refinament de les connexions (Cane et al., 2014; Yusifov et al., 2021).



Figura 1.10. Estructura de les espines dendrítiques.

Els components principals de l'espina són la xarxa de filaments d'actina i les proteïnes que es troben en la densitat postsinàptica. En aquesta regió hi trobem receptors de neurotransmissors, proteïnes bastida com la PSD-95, el citoesquelet d'actina, proteïnes d'unió a l'actina o molècules senyal. Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida a *Rochefort & Konnerth, 2012*.

Orgànuls. Les espines poden contenir diversos orgànuls entre els quals destaquen el reticle endoplasmàtic llis o poliribosomes. El reticle endoplasmàtic llis pot exercir com a magatzem de calci intracel·lular des d'on el calci pot ser alliberat en resposta a estímuls. Un dels orgànuls més importants en les espines, però, són els poliribosomes que es troben en l'eix dendrític a la base de l'espina i ocasionalment s'endinsen dins l'estructura de l'espina. Aquests orgànuls permeten la síntesi proteica local en el compartiment postsinàptic (Holt et al., 2019; Steward & Schuman, 2001). Els RNAm poden ser transportats als dominis subcel·lulars de la neurona per tal que la traducció localitzada ajudi a respondre ràpidament a l'activitat (Gamarra et al., 2021). S'han identificat diferents transcrits en les dendrites entre els quals convé destacar els RNAm de la CaMKII α , la MAP2A, la β -actin, l'Arc i la PSD-95, per la seva rellevància en la plasticitat sinàptica.

Receptors, canals iònics i molècules senyal. Els receptors postsinàptics es concentren en la zona propera al compartiment presinàptic de la superfície de l'espina (Bosch & Hayashi, 2012). Hi trobem receptors ionotròpics de glutamat (NMDAR i AMPAR) i receptors metabotròpics (mGluR). Una de les vies de senyalització amb més pes dins l'espina és la del calci. Els receptors de NMDA conjuntament amb els canals de calci dependents de voltatge i les reserves internes de calci modifiquen les concentracions de calci de l'espina. Increments en el calci intracel·lular desencadenen diferents cascades de senyalització que parteixen de la unió del calci a la calmodulina (CaM). Aquesta unió activa la CaMKII (Malenka & Bear, 2004) que fosforil·la diferents proteïnes sinàptiques regulant la seva estructura i funció. La CaMKII pot regular la plasticitat estructural de les espines i participar en els mecanismes de LTP i la LTD (Shibata et al., 2021; Yasuda et al., 2022).

Citoesquelet. L'estructura de l'espina està mantinguda per una xarxa de citoesquelet d'actina que permet sostenir els canals, els receptors i els components de la PSD (Nakahata & Yasuda, 2018). La xarxa està formada per actina filamentosa ramificada (F-actina) conectada a través de proteïnes d'unió a l'actina ABPs (Colgan & Yasuda, 2014; Hotulainen & Hoogenraad, 2010). Els filaments de F-actina es formen a partir de la polimerització de la G-actina. La remodelació de l'espina es produeix gràcies a cicles de polimerització/despolimerització de l'actina on la G-actina unida a l'ATP s'agrega al extrem positiu en creixement dels filaments i la G-actina unida a l'ADP es dissocia de l'extrem negatiu (Hotulainen & Hoogenraad, 2010). La LTP indueix el creixement de l'espina decantant el balanç de polimerització/despolimerització de l'actina cap a la polimerització, ajudant així a l'elongació dels filaments d'actina i l'expansió de la xarxa de filaments (Bosch et al., 2014). Els filaments d'actina són regulats per les ABPs que controlen la seva polimerització/despolimerització, nucleació, ramificació, "capping", entrecreuament i tràfic (Nakahata & Yasuda, 2018). Alguns exemples són la Proteïna relacionada amb l'actina 2/3 (Arp2/3; d'Actin related protein complex 2/3), la Cofilina o la Profilina. L'Arp2/3 està implicada en la nucleació i la formació de les ramificacions de filaments d'actina. La polimerització està potenciada per la Profilina que accelera l'intercanvi d'ADP a ATP, mentre que l'ADF/cofilina accelera la despolimerització unint-se a l'actina unida a ADP. Els microtúbuls es troben en l'estructura de la dendrita però no en la de l'espina, tot i que puntualment hi poden entrar de manera transitòria (Nakahata & Yasuda, 2018).

Els mecanismes de plasticitat a llarg termini poden provocar canvis en la densitat i morfologia de l'espina. La LTP s'associa amb l'engruiximent de l'espina, mentre que la LTD comporta la seva contracció (Nakahata & Yasuda, 2018) (Figura 1.11). La remodelació estructural de l'espina requereix de l'activació de vies de senvalització que finalitzen en la reorganització del citoesquelet d'actina. Per exemple, la CaMKII activada estimula l'activació de les petites GTPases de la família de Rho, Cdc42 i Rac1 que regulen el citoesquelet d'actina de diverses maneres. RhoA activa efectors posteriors de la via com la proteïna quinasa associada a Rho (ROCK; de Rho-associated protein kinase) que a la seva vegada fosforil·la la quinasa LIM (LIMK; de LIM kinase) i aquesta fosforil·la l'ADF/Cofilina. Cdc42 i Rac1 promouen la polimerització de l'actina a través de WASP i WAVE. Aquests complexes s'uneixen i regulen Arp2/3. La nucleació de l'actina per part de l'Arp2/3 permet el creixement de l'espina. També estabilitzen el citoesquelet inhibint la despolimerització provocada per ADF/Cofilina gràcies a efectors com la via PAK/ROCK-LIMK (Bosch et al., 2014). Canvis en la matriu extracel·lular i les molècules d'adhesió sinàptiques com la N-cadherina o Neuroligina també afecten la morfologia de l'espina (Missler et al., 2012; Nagappan-chettiar et al., 2018).

PLASTICITAT DE LES ESPINES



Figura 1.11. Canvis estructurals en les espines induïts per la LTP i la LTD.

Els mecanismes de potenciació o depressió a llarg termini modifiquen la morfologia, l'estructura i la composició de les espines dendrítiques. La LTP pot incrementar el nombre d'espines dendrítiques induint la formació de noves estructures, així com augmentar la mida de les espines. En canvi, la LTD pot provocar una disminució en l'àrea de les espines que es tradueixi en la pèrdua de les estructures. Els mecanismes de potenciació o depressió a llarg termini regulen la dinàmica de les espines a través d'efectors intracel·lulars o canvis en el citoesquelet. Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida a *Rochefort & Konnerth,* 2012.

2.2 Neurogènesi adulta

Fins a principis de la dècada dels 60, un dels dogmes més estesos en el camp de la neurociència deia que les neurones només es formaven durant el desenvolupament embrionari. Els estudis realitzats per Altman i els seus col·laboradors van demostrar per primera vegada que la formació de neurones en rosegadors persisteix després del naixement, i es manté durant la vida adulta (Altman, 1962; Altman & Das, 1965). El descobriment ampliava el concepte de plasticitat neuronal i descobria noves vies per entendre i explicar el funcionament de la memòria i l'aprenentatge (Gage, 2019). Al procés de formació de noves neurones funcionals a partir de les NSCs i els progenitors neurals després del naixement se'l va denominar neurogènesi adulta. Si la neurogènesi adulta existeix o no en humans, es un tema que ha encès el debat en la comunitat científica i pel qual encara no hi ha una resposta clara. D'una banda, hi ha estudis que defensen que la producció de neurones es manté al llarg de tota la vida en regions específiques, i podria estar implicada en la patogènesi de malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer (Boldrini et al., 2018; Eriksson et al., 1998; Ernst et al., 2014; Moreno-Jiménez et al., 2019, 2021). De l'altra banda, hi ha investigacions que postulen que la capacitat de generar neurones disminueix dràsticament després de la infància i, per tant, no tindria un paper determinant en els mecanismes de plasticitat neuronal adulta (Dennis et al., 2016; Galán et al., 2017; Knoth et al., 2010; Sorrells et al., 2018). Un dels principals obstacles per aclarir l'existència de la generació de neurones en l'humà adult són les limitacions i les dificultats tècniques en els procediments experimentals (Duque et al., 2022).

L'existència de la neurogènesis adulta en altres espècies de mamífers com els rosegadors gaudeix d'un major consens (Charvet et al., 2018; Gage, 2019). En aquests mamífers, la neurogènesi adulta recapitula la seqüència d'esdeveniments de la neurogènesi embrionària incloent la proliferació, la determinació del llinatge, la migració, la diferenciació, la sinaptogènesi i la integració funcional de les neurones en els circuits (Gage, 2019). A diferència del procés embrionari, la neurogènesi adulta és un fenomen localitzat en dues regions concretes del cervell anomenades nínxols o zones neurogèniques: la SVZ dels ventricles laterals i la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp (SGZ; de *subgranular zone*). En menor grau, les neurones també poden produir-se en altres zones neurogèniques no canòniques, en condicions basals o després de lesions (Feliciano & Bonfanti, 2015).

2.2.1 Cèl·lules mare neuronals adultes

Les NSCs que durant el desenvolupament originen les neurones i les cèl·lules de la glia del sistema nerviós desapareixen de la major part de regions després del naixement. En les zones neurogèniques però, persisteixen i es mantenen actives en l'etapa adulta (Toda & Gage, 2018). La població de NSCs adultes està constituïda principalment per RGCs i progenitors neurals (Mira & Morante, 2020). En relació al seu origen, les dades recollides fins ara apunten a que les NSCs de la SVZ i SGZ tenen diferents procedència i característiques (Berg et al., 2018; Bond et al., 2022; Morales & Mira, 2019; Obernier & Alvarez-Buylla, 2019). Les RGCs de la VZ comparteixen característiques morfològiques i funcionals amb els progenitors embrionaris. A nivell morfològic, presenten un cili primari en contacte amb el CSF i polaritat apicobasal (Obernier & Alvarez-Buylla, 2019). En les fases intermèdies de la neurogènesi embrionaria, una subpoblació de les RGCs es divideix i genera els precursors de les RGCs adultes. Aquestes noves cèl·lules expressen la molècula d'adhesió vascular 1 (VCAM1; de Vascular cell adhesion molecule 1), una molècula d'adhesió important en el mateniment de les propietats de les cèl·lules mare (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015). Posteriorment, entre els dies E13.5 i E15.5 del desenvolupament en ratolins, una segona població de les RGCs entra en quiescència (Merkle et al., 2007). Aquesta mateixa subpoblació de progenitors genera cèl·lules ependimals que regulen la composició del CFS. La conversió final de VZ a SVZ té lloc en la primera setmana postnatal coincidint amb la diferenciació de les cèl·lules ependimals i el desplaçament dels cossos cèl·lulars de les RGCs adultes a la SVZ. Les RGCs adultes donaran lloc a diferents subtipus d'interneuronnes en funció de la seva localització en els eixos anterior-posterior i dorso-ventral (Obernier & Alvarez-Buylla, 2019). L'especificació regional d'aquests progenitors és definida a inicis del desenvolupament segons la posició que ocupen les cèl·lules i és heretada per les NSCs adultes (Alvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002; Fuentealba et al., 2015; Merkle et al., 2007). En el cas de les NSCs de la SGZ, la seva procedència està unida al desenvolupament del gir dentat. Tal com s'ha descrit en el Capítol 1, les RGCs del gir dentat es desuneixen del ventricle i migren cap l'hipocamp primitiu. Després de la primera setmana postnatal, la capcaitat proliferativa d'aquestes cèl·lules disminueix dràsticament (Bond et al., 2022; Berg et al., 2019). En aquesta setmana, la majoria de cèl·lules mare del gir dentat entren en un estat de quiescència de llarga durada (Berg et al., 2019).

Així doncs, en el teixit adult, les NSCs es troben en un estat de quiescència o no proliferatiu en el qual hi ha un arrest reversible del cicle cel·lular en les fases G0 i G2 (Urbán et al., 2019). Les cèl·lules quiescents presenten una baixa taxa metabòlica, però una alta sensibilitat a estímuls externs. La quiescència és
necessària per preservar la població de progenitors i evitar exhaurir-ne les reserves. De fet, l'estat quiescent és activament mantingut a través d'un programa molecular que elimina la diferenciació, prevé la senescència, assegura la reversibilitat de l'arrest del cicle cel·lular i evita l'acumulació de danys en el DNA, les proteïnes i els mitocondris (Morales & Mira, 2019; Urbán et al., 2019). Les cèl·lules quiescents, sota determinades condicions fisiològiques activen a les NSCs i promouen la seva entrada al cicle cel·lular (Urbán et al., 2019).

La població de NSCs de les zones neurogèniques adultes presenta una heterogeneïtat encara més complexa que en el sistema en desenvolupament. Anàlisis transcriptòmiques i d'expressió en cèl·lula única revelen un escenari d'evolució continuada de les NSCs des d'un estat de quiescència profunda a un estat d'activació (Basak et al., 2018; Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Shin et al., 2015). En les cèl·lules quiescents s'hi detecta un enriquiment en gens relacionats amb la comunicació cèl·lula-cèl·lula i, cèl·lula-matriu extracel·lular i gens implicats en l'adhesió cel·lular (Basak et al., 2018; Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Shin et al., 2015). Alguns exemples de gens associats a l'estat de quiescència són ApoE3, Aldoc o Id3. Les cèl·lules quiescents també expressen el factor repressor REST (de Repressor element 1 silencing transcription factor) que manté la quiescència, tot inhibint l'expressió de gens implicats en la biogènesi de ribosomes i el cicle cel·lular. L'expressió d'aquests gens disminueix en la transició entre quiescència i activació mentre que la de gens com Fgfr3, Egfr, Ki67 o Mcm2 augmenta. En les cèl·lules actives, en canvi, els transcriptomes mostren major expressió de genes implicats en la transcripció, la traducció i la reparació del DNA. L'activació també implica la desconnexió gradual de les vies de senvalització extrínseca i un canvi en el metabolisme de les cèl·lules de glicòlisi a fosforil·lació oxidativa (Basak et al., 2018; Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Shin et al., 2015; Urbán et al., 2019). Les cèl·lules actives comencen a expressar els marcadors EGFR, Ki67 o MCM2. A més, en estudis de proliferació poden ser detectades a partir de la incorporació d'anàlegs de nucleòtids com el BrdU (Codega et al., 2014; Urbán et al., 2019).

Un cop activades, les NSCs poden adoptar diferents modalitats de divisió per tal de renovar la població de progenitors tot fabricant progènie més diferenciada. Poden realitzar divisions asimètriques autorenovadores o bé divisions simètriques proliferatives i neurogèniques (Obernier & Alvarez-Buylla, 2019). El tipus de divisió ve en gran part determinat per senyals del microtentorn. Per exemple, l'eliminació de la senyalització per GABA en el gir dentat provoca una sortida prematura de la quiescència i activa les divisions simètriques per augmentar la generació de neurones.

2.2.2 Zones neurogèniques

Les NSCs adultes es localitzen en microentorns especialitzats o nínxols neurogènics on troben les condicions òptimes per sobreviure i dividir-se. Els microentorns integren les vies de senyalització que controlen el manteniment de les NSCs en un estat immadur quiescent, la seva activació i proliferació, i la progressió del llinatge (Yao et al., 2016; Zhang & Zhang, 2018; C. Zhao et al., 2008). Els senyals inclouen citoquines, factors de creixement i factors tròfics, neurotransmissors, mecanismes epigenètics així com variables fisiològiques i patològiques. Les dues zones neurogèniques principals, la SVZ i la SGZ, comparteixen algunes característiques generals, però mostren diferències en la seva composició, dinàmica i regulació que mereixen ser tractades per separat.

Neurogènesi a la zona subventricular

La SVZ es troba a la paret externa dels ventricles laterals, per sota de l'epèndima i en contacte amb el CFS i el plexe vascular (Alvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002; Merkle et al., 2007). En aquesta zona hi ha tres tipus de progenitors: les cèl·lules de tipus A, B i C. Els progenitors de tipus B són NSCs, concretament RGCs. Es tracta de cèl·lules quiescents que un cop activades proliferen i donen lloc als progenitors de tipus C (Doetsch et al., 1999). Els progenitors de tipus C o IPCs tenen una alta taxa de proliferació, augmenten la població de progenitors i produeixen les cèl·lules de tipus A (Figura 1.12, panell superior). Finalment, els progenitors de tipus A o neuroblasts es diferencien per donar lloc a interneurones del bulb olfactiu (Alvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002; Merkle et al., 2007). Les neurones generades en la SVZ recorren llargues distàncies fins al bulb olfactiu seguint la corrent migratòria rostral (Ihrie & Álvarez-Buylla, 2011). En el bulb olfactiu maduren i esdevenen interneurones de les capes granular i periglomerular (Lledo & Valley, 2016; C. Zhao et al., 2008) (Figura 1.12, panell inferior). La migració de les noves neurones generades està regulada per molècules senvals i interaccions cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu mediades per CAMs. El bulb i el sèptum emeten senvals atraients i repulsius que guien la migració en cadena de les interneurones. Les noves neurones s'integren i modulen els circuits prexistents participant en funcions cognitives com l'aprenentatge, el processament de la informació o de memòries olfactives (Lazarini & Lledo, 2011; Lledo & Valley, 2016).

NEUROGÈNESI ADULTA A LA SVZ

Proliferació de les RGCs



Figura 1. 12. Neurogènesi adulta a la zona subventricular.

Representació del procés de neurogènesi a la SVZ dels ratolins adults. En el panell superior, es mostra un tall coronal amb la zona subventricular marcada. En aquesta regió hi trobem els progenitors de tipus B (RGCs) que en dividir-se donen lloc als de tipus C (IPCs). Els progenitors de tipus C generen les cèl·lules de tipus A (neuroblasts) que surten de la SVZ cap a la seva destinació final. En el panell inferior, s'observa un tall sagital on es representa la migració dels neuroblasts formats des de la SVZ cap al bulb olfactiu seguint la corrent migratòria rostral. Un cop arriben al bulb s'acaben de diferenciar en interneurones granulars (en color lila) i interneurones periglomerulars (en color gris) que formen l'estructura de l'epiteli del bulb. GCL: capa de cèl·lules granulars; GL: capa glomerular; LV: ventricle lateral; ONL: capa del nervi olfactiu; RMS: corrent migratòria rostral; RGC: cèl·lula de la glia radial; SVZ: zona subventricular, VZ: zona ventricular. Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida a *Alvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002; Lim & Avarez-Buylla et al., 2016.*

Neurogènesi a la zona subgranular

La SGZ és la zona que es troba entre la capa granular i l'hilus del gir dentat. Aquesta regió ofereix un entorn permissiu a les RGCs que afavoreix el seu manteniment i tot promovent la seva proliferació i diferenciació a cèl·lules granulars del gir dentat (Gonçalves et al., 2016; Obernier & Alvarez-Buylla, 2019; C. Zhao et al., 2008) (**Figura 1.13**).





Figura 1. 13. Neurogènsi adulta a la zona subgranular de l'hipocamp.

Representació esquemàtica del procés neurogènic al gir dentat de l'hipocamp adult. Els progenitors de tipus I són RGCs que es troben en un estat quiescent en el qual expressen gens com *ApoE3* o *Id3*. Diferents estímuls poden activar les cèl·lules fent que entrin al cicle cel·lular. Els gens característics d'aquest procés d'activació són l'*Egfr3* o l'*Egfr*. Un cop activades, es divideixen i donen lloc a progenitors de tipus II o IPCs. En aquest punt trobem una alta expressió de gens relacionats amb el cicle cel·lular com Ki67. Els progenitors de tipus II produeixen els de tipus III o neuroblats que es diferencien a neurones granulars. Les neurones migren durant el procés de diferenciació, maduren i s'integren funcionalment a la capa granular del gir dentat. Al llarg del procés, s'expressen diferents marcadors que permeten identificar els principals tipus cel·lulars. Els progenitors de tipus I expressen Nestina, GFAP i Sox2. L'expressió de Sox2 es manté en progenitors

de tipus IIa que també comencen a expressar Tbr2. Els nivells del marcadors de proliferació disminueixen a mesura que es fa la transició cap a progenitors de tipus III i tipus III. En en els progenitors de tipus III comença l'expressió de marcadors del llinatge neuronal com DCX. Les neurones un cop maduren expressen marcadors com NeuN. Font: elaboració pròpia a partir de les dades recollides a *Urbán et al., 2019*.

En la SGZ hi trobem progenitos de tipus I o RGCs que expressen marcadors com Sox2, Nestina i GFAP. En dividir-se generen els progenitors de tipus II o progenitors intermedis (IPCs), unes cèl·lules amplificadores transitòries. Els progenitors de tipus II es subdivideixen en tipus IIa i II2. Mentre que els progenitors de tipus IIa expressen marcadors proliferatius com Sox2 o Tbr2, els de tipus IIb comencen a expressar marcadors neurals com la DCX o la PSA-NCAM. En aquest punt del procés neurogènic es determina el llinatge de les cèl·lules filles. En la majoria de casos, els progenitors de tipus II donaran lloc a neurones granulars del gir dentat (**Figura 1.13**). Un cop determinen el seu destí, esdevenen progenitors de tipus III o neuroblasts.

Els neuroblasts es diferencien a neurones granulars del gir dentat que migren curtes distàncies fins a la capa granular. Un cop arriben a la capa granular inicien la seva diferenciació estenent la dendrita cap a la capa molecular i l'axó cap a l'hilus. Les cèl·lules adquireixen el fenotip neuronal dues setmanes després, quan la dendrita arriba a l'extrem de la capa molecular externa i l'axó a la CA3 de l'hipocamp. A la tercera setmana, es comencen a formar les espines dendrítiques i s'estableixen els contactes amb el circuit local. A partir d'aquí, les cèl·lules adquireixen propietats electrifisiològiques de cèl·lules madures i expressen com a marcador NeuN i MAP2 (Götz & Huttner, 2005; Obernier & Alvarez-Buylla, 2019) (**Figura 1.13**).

2.2.3 Regulació de la neurogènesi adulta

Tant a la SVZ com a la SGZ, un gran nombre de factors regulen el manteniment de les NSCs, la seva activació i proliferació, i la diferenciació i maduració de les neurones generades *de novo*. Aquests senyals són integrats i vehiculats pels nínxols neurogènics que no només atorguen un suport físic a les NSCs, sinó que també faciliten la transducció de senyals (Gage, 2019). Els principals factors intrínsecs i ambientals que regulen la neurogènesi adulta es detallen a continuació.

Vasculatura i CFS. Les cèl·lules de l'endoteli vascular produeixen factors que modifiquen la neurogènesi de manera directa o indirecta a través de la secreció de substàncies i el transport de molècules produïdes per altres cèl·lules. La secreció de factors tròfics (BDNF, VEGF) afecta la proliferació de les RGCs i la diferenciació de les neurones. A més, les interaccions establertes entre les cèl·lules endotelials i les NSCs promouen la quiescència de les NSCs (Morante-Redolat &

Porlan, 2019). En el cas de la SVZ, el CFS i el plexe coroide regulen el comportament de les NSCs adultes de manera similar a la regulació de les NSCs embrionàries. A més, amb l'edat, el plexe coroide presenta una marcada d'expressió de gens dependents d'interferó 1. Si es bloqueja aquesta via, es restaura la funció cognitiva i la neurogènsi al gir dentat (Bjornsson et al., 2015).

Components cel·lulars. Entre les principals cèl·lules que regulen el procés neurogènic hi trobem NSCs, neurones i cèl·lules de la glia. Les NSCs tenen la capacitat de regular el seu propi nínxol neurogènic alliberant factors difusibles que controlen el desenvolupament de les noves neurones (Bonafina et al., 2020). Les interneurones inhibitòries i les neurones glutamatèrgiques també poden controlar la integració de les noves neurones formades (Haniff et al., 2018). La micròglia participa en la fagocitosi de cèl·lules granulars apoptòtiques. A més, poden regular la neurogènesi a través d'interaccions cèl·lula-cèl·lula i factors secretables. L'activació de vies proinflamatòries altera diferents etapes del procés de neurogènesi (Bjornsson et al., 2015; Bonafina et al., 2020). Altres cèl·lules de la glia com els astròcits controlen la proliferació, la migració, la diferenciació i la integració sinàptica de les neurones gràcies a molècules de membrana i factors solubles com FGF-2, Wnt i citoquines (Bonafina et al., 2020; Bjornsson et al., 2015). En la SVZ, hi ha cèl·lules ependimals que poden modificar la composició del CFS i afectar la neurogènesi a través de diferents vies. Per exemple, expressen Noggin que es un antagonista de BMP i alliberen factors com PEDF que promouen l'autorenovació de les NSCs (Bjornsson et al., 2015).

Senyals locals difusibles. Hi ha factors secretables que poden ser alliberats per diferents components del nínxol neurogènic per tal de controlar el comportament de les NSCs. Els BMPs produïts per les neurones granulars promouen la quiescència i el mateniment de les NSCs a llarg termini inhibint la proliferació dels progenitors neurals (Morales & Mira, 2019). Les molècules de la família de Wnt produïdes per les NSCs i les cèl·lules de la glia promouen la renovació i la proliferació dels progenitors neurals (Bowman et al., 2013; Lie et al., 2005; Qu et al., 2013). La resposta a través de la via no canònica de Wnt manté la quiescència a la SVZ, promovent l'ancoratge de les cèl·lules de tipus B al nínxol a través de la SVZ i de l'hipocamp afectant al procés de proliferació i diferenciació (Urbán i Guillemot, 2014). Els factors de creixement com FGF i EGF també estimulen l'activació i la proliferació de les cèl·lules mare. De fet, els anàlisis de transcriptòmica revelen nivells alts d'expressió dels receptors d'aquests factors en NSCs activades (Morizur et al., 2018; Shin et al., 2015).

Neurotransmissors. L'estat de quiescència de les NSCs pot ser regulat per neurotransmissors com la serotonina, el glutamat o el GABA. En la SGZ, les interneurones gabaèrgiques inhibeixen la proliferació de les NSCs. Les fibres molsoses promouen la quiescència de les NSCs de manera indirecta amb l'alliberament de GABA per les interneurones parvalbúmina positives, però promou l'activació NSCs a través de l'alliberament directe de glutamat a les NSCs (Berg et al., 2013; Matsubara et al. 2021).

Factors ambientals. L'activitat de les NSCs s'ajusta als requeriments de l'organisme en resposta a estímuls fisiològics i del comportament. L'exercici físic, els nous entorns, les interaccions socials, la composició de la dieta o l'estrès poden afectar la proliferació i la diferenciació de les NSCs (Gage, 2019; Kempermann et al., 2018). S'ha descrit que l'aïllament social disminueix proliferació de les cèl·lules i la neurogènesi en la SGZ (Holmes, 2016). En canvi, córrer augmenta la proliferació i la supervivència dels IPCs, i promou la maduració de les noves neurones generades. El procés neurogènic també està altament influenciat per l'edat, el sexe, els estats metabòlics i els ritmes circadians. Amb l'edat es dóna una disminució de la capacitat regenerativa deguda a canvis en el comportament de les NSCs, dels nínxols neurogènics i dels senyals sistèmics (Kempermann, 2015; Moreno-Jiménez et al., 2021).

Factors epigenètics. Els mecanismes epigenètics regulen el procés de neurogènesis a través de la resposta coordinada a senyals extracel·lulars. D'aquesta manera determinen l'expressió espacial i temporal de reguladors que controlen la proliferació, la determinació del llinatge i la diferenciació de les NSCs (Yao et al., 2016). Les modificacions epigenètiques inclouen la metil·lació del DNA, la modificació de les histones i els RNAs no codificants. Alguns factors ambientals com l'exercici físic poden estimular la metilació del DNA i evitar la unió de factors de transcripció als seus promotors, limitant així l'expressió de determinats gens que poden regular la neurogènesi. Les modificacions en les histones, com la desacetilació, també regulen el manteniment de les NSCs. Per últim, els RNAs no codificants estan implicats en la diferenciació, l'establiment de connexions o la integració funcional de les noves neurones (Yao et al., 2016).

Matriu extracel·lular i molècules d'adhesió. Les funcions principals de la matriu són les de donar suport estructural i transduir els senyals moleculars que regulen el desenvolupament de les NSCs (Bonafina et al., 2020). En el cas de la SVZ, les extensions de la matriu extracel·lular en el ventricle lateral es coneixen com a fractons (Morante-Redolat & Porlan, 2019). Aquestes estructures són riques en laminina, heparan sulfat, perlecan, nidògen i col·lagens. La seva funció podria ser estructural durant la migració de les cèl·lules. També podrien ajudar a concentrar i activar els factors tròfics (Bjornsson et al., 2015). En la SGZ, la matriu conté molècules com la Reelina (Pujadas et al., 2010; Teixeira et al., 2012) o els proteoglicans (Bonafina et al., 2020; Yamada et al., 2018) que també controlen del

procés neurogènic. De manera complementària a les funcions de la matriu extracel·lular, les CAMs també juguen papers destacats durant els esdeveniments neurogènics durant l'etapa adulta (S. Bian, 2013).

Capítol 3. NCAM2

La molècula d'adhesió neuronal 2 (NCAM2; de *neural cell adhesion molecule 2*) fou identificada per primer cop l'any 1997 en el bulb olfactiu dels rosegadors (Alenius & Bohm, 1997; Paoloni-Giacobino et al., 1997; Yoshihara et al., 1997). Es tracta d'un dels membres de la família NCAM, un grup de molècules d'adhesió cel·lular amb funcions destacades en la formació del sistema nerviós.

3.1. Molècules d'adhesió cel·lular

Les molècules d'adhesió cel·lular (CAMs) constitueixen un grup divers de glicoproteïnes de membrana implicades en l'adhesió cel·lular i la transducció de senvals (Togashi et al., 2009). Exerceixen les seves funcions a través de les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu, homofíliques o heterofíliques, establertes pels seus ectodominis. D'aquesta manera, i tal com s'ha pogut constatar en els capítols anteriors, les CAMs assumeixen rols destacats en el desenvolupament, la connectivitat, la plasticitat i el correcte funcionament del sistema nerviós (Moreland & Poulain, 2022; Sytnyk et al., 2017). Específicament, durant el desenvolupament embrionari, les CAMs poden controlar la divisió i la diferenciació de les cèl·lules mare, guiar la migració de les neurones, contribuir a la maduració de les mateixes i participar en la construcció de les connexions sinàptiques (Gerrow & El-Husseini, 2006; R. Huang et al., 2020; Missaire & Hindges, 2015; Pollerberg et al., 2013; Schmid & Maness, 2008; Solecki, 2013; Südhof, 2008). La seva eminent aportació continua en l'etapa adulta, un període en el qual les CAMs dirigeixen el manteniment i la plasticitat sinàptiques, i regulen la neurogènesi adulta (Dalva et al., 2007; Kilinc, 2018; Lim et al., 2022; Missler et al., 2012; Morante-Redolat & Porlan, 2019). Donat el seu cabdal i polifacètic paper en la formació i conservació del sistema nerviós, la disrupció de les seves funcions pot desencadenar alteracions en el correcte funcionament del sistema. De fet, nombroses CAMs han estat associades amb desordres del neurodesenvolupament, trastorns psiquiàtrics i malalties neurodegeneratives (Moreland & Poulain, 2022; Sakurai, 2017).

3.1.1. Estructura

L'ampli ventall de funcions de les CAMs és possible gràcies als patrons d'expressió espacio-temporal i l'acció d'una gran diversitat de molècules. Les CAMs es classifiquen en diferents famílies que agrupen molècules amb estructures extracel·lulars similars. Fins a l'actualitat, les principals famílies de CAMs descriten són les integrines, les cadherines, les neurexines/neuroligines, les taurines i la superfamília de les immunoglobulines (IgCAMs, de *immunoglobulin cell adhesion molecules*) (**Figura 1.14**).

Cadherines

La família de les cadherines comprèn un variat grup de proteïnes transmembrana amb repeticions cadherina (Cdh) en el seu ectodomini (Figura 1.14). Aquests dominis cadherina presenten plegaments en fulla ß que són importants per a la formació de les unions. Les cadherines estableixen unions cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu extracel·lular dependents de calci en cis o trans (Agustín-Durán et al., 2021; Shapiro et al., 2007). La proteïna també presenta un domini transmembrana i diferents dominis citoplasmàtics. A través de la cua citoplasmàtica i la unió amb les catenines del citosol, les cadherines poden interaccionar de manera indirecta amb el citoesquelet d'actina (Meng & Takeichi, 2009). En vertebrats, les cadherines s'agrupen en diferents subfamílies entre les quals destaquen les cadherines clàssiques i les protocadherines. Les cadherines clàssiques inclouen les cadherines de tipus I (CDHI, CDH2, i CDH3 CDH4) i les cadherines de tipus II (CDH6, CDH7, CHD8, CDH9, CDH10, CDH11, CDH12, CDH 18, CDH20 i CDH24) (Polanco et al., 2021). Pel que fa a les protocadherines, s'han descrit dues subfamílies en funció de l'estructura del gen que les codifica, les protocadherines agrupades (en anglès clustered) i les no agrupades (en anglès non-clustered) (Moreland & Poulain, 2022; Shapiro et al., 2007).

Integrines

Les integrines conformen la família estructuralment més complexa de CAMs. Es tracta de receptors de membrana constituïts per dues unitats, α i β , que en el transcurs de la interacció dimeritzen donant lloc a heterodímers. Les proteïnes a i β estan constituïdes per diferents dominis amb enllacos flexibles entre ells. Cada una d'aquestes unitats conté un domini extracel·lular complex, un únic domini transmembrana i una cua citoplasmàtica curta (Shapiro et al., 2007) (Figura 1.14). En les integrines α , l'ectodomini presenta cinc subdominis, mentre que en les β s'han descrit vuit subdominis. Els heterodímers formats per les integrines medien la interacció amb els components de la matriu extracel·lular (Moreland & Poulain, 2022). La transmissió bidireccional de senyals a través de la membrana és possible gràcies a canvis de conformació de la proteïna en resposta al lligand (Humphries et al., 2003). Els canvis conformacionals poden ser induïts per les interaccions amb altres molècules a través dels dominis extracel·lular i intracel·lular (Shapiro et al., 2007) i produeixen la modificació d'adaptadors com la vinculina o la tal·lina, i l'activació de vies de senvalització que regulen el citoesquelet d'actina i l'adhesió focal a través de quinases com FAK. En el SNC, les diferents subunitats de les integrines són expressades en neurones, cèl·lules de la glia, meninges i cèl·lules endotelials (Shapiro et al., 2007).

Neurexines/Neuroligines

La interacció entre dos grans grups de CAMs, les neurexines i les neuroligines, és clau en la formació del cervell i la construcció de les sinapsis excitatòries i inhibitòries. Les neurexines són proteïnes de superfície amb milers d'isoformes α o β originades per l'empalmament alternatiu de tres gens (Shapiro et al., 2007) (**Figura 1.14**). Les α -neurexines contenen sis dominis LNS (de *laminin, neurexin, sex-hormone binding globulin domain*) amb tres dominis tipus EGF intercalats. Les β -neurexines presenten ún unic domini LNS en la seva fracció extracel·lular (Südhof, 2008). Les neurexines realitzen unions intercel·lulars amb receptors de superfície coneguts com a neuroligines. La seqüència extracel·lular de les neuroligines està formada per un únic domini homòleg a l'acetilcolinesterasa. En els vertebrats, aquests receptors venen codificats per quatre gens que estan altament expressats en el SNC.

Superfamília de les immunoglobulines

La superfamília de les immunoglobulines (IgCAMs; de immunglobulin-like cell adhesion molècules) és el grup més divers i ancestral de les CAMs (Figura 1.14). Les IgCAMs poden presentar diferents isoformes transmembrana o ancorades a la membrana а través d'un grup glicosilfosfatidilinosital (GPI: de glycosilphosphatidylinositol) que s'originen per empalmament alternatiu dels gens (Shapiro 2007). El domini extracel·lular de les IgCAMs pot estar format per diferents combinacions de mòduls tipus immunoglobulina (Ig; de immunoglobulin) i fibronetina III (FnIII; de *fibronectin type III*). El grup de le IgCAMs també es divideix en diferents subfamílies: les CAMs sinàptiques (SynCAMs; de synaptic cell adhesion molecules), les contactines, les L1CAM (L1CAM, NrCAM, neurofascines), la molècula d'adhesió cel·lular associada a la síndrome de Down (DSCAM; de Down syndrome cell adhesion molecule) i les molècules d'adhesió neuronal (NCAM, de Neural cell adhesion molecule). El grup de les NCAM està integrat per dues proteïnes, la NCAM1 i la NCAM2. Els gens que codifiquen per ambdues proteïnes són gens paràlegs generats per la duplicació del genoma (Makino & McLysaght, 2010). Aquest origen genètic comú ha resultat en una estructura i unes funcions similars. NCAM1, identificada l'any 1970, presenta tres isoformes de diferent pes molecular i expressió: NCAM180 s'expressa en neurones adultes; NCAM140 s'expressen en etapes embrionàries i adultes; i la NCAM120 s'expressa majoritàriament en cèl·lules de la glia. Les interaccions homofíliques i heterofíliques formades per la molècula activen vies de senvalització que afecten els nivells de calci i la reorganització del citoesquelet (Mehrabian et al., 2016). Les funcions de la proteïna són possibles gràcies a múltiples interaccions amb receptors de factors de creixement com el Receptor de factors de creixement fibroblàstic (FGFR; de Fibroblast growth factor receptor), receptors de

neurotransmissors o quinases (Kiselyov et al., 2005; Mehrabian et al., 2016). Part d'aquestes interaccions es donen a partir de polisialització (PSA; de *polysialic acid*) de la proteïna durant el procés de modificació postraduccional. Els nivells de polisialització augmenten durant el desenvolupament embrionari, però disminueixen progressivament en etapes postnatals. El grup PSA és crític per a les funcions de la proteïna en neurogènesi, migració neuronal o el creixement neurític (Mehrabian et al., 2016).



Figura 1.14. Molècules d'adhesió cel·lular.

Les famílies principals de CAMs expressades en el sistema nerviós inclouen les cadherines, les integrines, la superfamília de les immunoglobulines i les neurexines/neuroligines. Els diferents membres de cada família presenten dominis extracel·lulars similars formats per repeticions de mòduls específics. Cdh: cadherina; EGF: factor de creixement epidèrmic; FnIII: fibronectina III; Ig: immunoglobulina; LNS: *laminin, neurexin, sex-bormone binding globulin.* Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida a *Moreland & Poulain, 2022.*

3.1.2. Funcions

Les CAMs exerceixen un ampli ventall de funcions en el desenvolupament emrbrionari i durant els mecanismes de plasticitat neuronal adulta.

Desenvolupament del sistema nerviós

En els inicis del desenvolupament del sistema nerviós, durant el procés de neurogènesi, les CAMs controlen el comportament de les NSCs de la zona ventricular. L'adhesió proporcionada per les CAMs regula la proliferació dels progenitors, l'especificació del destí cel·lular, la migració i la diferenciació de les

neurones (Durán et al., 2021). La N-cadherina (o CDH2) forma part de les unions adherents entre NECs i RGCs que ajuden a mantenir la seva polaritat i a conservar la integritat de la VZ (Durán et al., 2021). Les perturbacions dels contactes establerts per les CAMs provoca defectes en la corticogènesi, concretament, en ratolins en els quals s'ha eliminat l'expressió de la N-cadherina es detecta un increment en la proliferació de les RGCs i una major presència de neurones de les capes corticals altes (Durán et al., 2021). Les integrines regulen la dinàmica de les NSCs gràcies a la integració dels senvals de la matriu extracel·lular (Morante-Redolat & Porlan, 2019). Aquestes molècules d'adhesió es troben en el procés basal de les RGCs on estableixen unions amb la laminina que ajuden ancorar les cèl·lules a la superfície pial. La disrupció de les integrines en el còrtex en desenvolupament disminueix el nombre de bRGCs, provoca la desunió de les cèl·lules, l'apopotosi i afecta en generar al procés de neurogènesi (Ferent et al., 2020; Morante-Redolat & Porlan, 2019). Alguns membres de la família de les IgCAMs participen igualment en el control de la neurogènesi embrionària. Per exemple, la proteïna NCAM1 regula la proliferació dels progenitors neurals i promou l'especificació cap al llinatge neuronal (Huang et al., 2020). S'ha descrit que la sobreexpressió de la isoforma NCAM140 augmenta la proliferació de les RGCs in vivo (Boutin et al., 2009). En canvi, l'eliminació selectiva de NCAM1 en els progenitors neurals disminueix la seva proliferació i retarda la formació de les neurones corticals de projecció (Huang et al., 2020; Shin et al., 2015).

Un cop formades les cèl·lules, les CAMs contribueixen a la correcta migració de les neurones fins a la seva posició final. En les primeres etapes del procés migratiu, la N-cadherina ajuda a la translocació somal de les neurones a través de l'establiment d'unions homofiliques (Franco et al., 2012). En etapes més posteriors, participa tant a la migració radial com a la tangencial. D'una banda, ajuden a establir les connexions entre neurones i fibres radials durant la migració de les neurones corticals. D'altra banda, en la migració tangencial de les interneurones, les cadherines promouen la motilitat de les cèl·lules (Durán et al., 2021). Un dels punts claus per a la migració de la neurones és l'establiment de la polaritat i la conversió de cèl·lula MP a BP. La contactina TAG-1 participa en la transició de cèl·lula MP a BP en les primeres fases de la migració neuronal. La disfunció d'aquesta proteïna impossibilita la transició de MP a BP i provoca errors en la migració de les neurones (Suter et al., 2020). Les integrines regulen la migració de les neurones fent possible l'ancoratge de les fibres de la glia radial a la superfície pial i mediant les interaccions entre les fibres i les neurones postmitòtiques en migració (Belvindrah et al., 2007; Ferent et al., 2020; Park & Goda, 2016). En el cas de les IgCAMs, la L1CAM afavoreix la locomoció de les cèl·lules en la IZ i la translocació somal de les neurones corticals (Tonosaki et al., 2014). Les nectines són importants per la progressió de les cèl·lules en migració, ja que permeten l'ancoratge del seu procés líder a la MZ (Agustín-Durán et al., 2021). Per útlim, la PSA-NCAM regula la migració tangencial i radial del precursors neurals corticals i permet la migració en cadena de les interneurones des de la SVZ al bulb olfactiu (Angata et al., 2007).

Durant el trajecte migratiu comença el procés de diferenciació de les cèl·lules que finalitza un cop la neurona ha arribat a la seva posició final. Diverses CAMs cooperen al llarg d'aquest procés per faciltiar la correcta formació dels compartiments axo-dendrítics. L'adhesió cel·lular ajuda a polaritzar les cèl·lules a partir de l'agrupament de les molècules en diferents complexes de membrana. A més, les CAMs ofereixen l'enllaç entre el domini extracel·lular i el citoesquelet que permet adaptar les estructures de la cèl·lula en resposta a estímuls inductors de la polarització (Gärtner et al., 2015). Prèviament s'ha descrit que la TAG-1 és necessària per l'especificació de l'axó, considerat l'esdeveniment de la polarització neuronal. La funció principal de les CAMs, però, és l'elongació i guia axonal. Els contactes establerts per les proteïnes permeten el creixement, la navegació, la fasciculació i la selecció de la diana per part dels axons (Moreland & Poulain, 2022). Les molècules d'adhesió proporcionen la força adhesiva necessària per a que el con de creixement avanci a través de les interaccions amb el citoesquelet d'actina (Moreland & Poulain, 2022; Pollerberg et al., 2013). Les cadherines, les integrines i les neuroligines estan altament expressades en els cons de creixement on contribueixen a la detecció de senvals de l'entorn i a l'elongació dels axons (Moreland & Poulain, 2022). La unió de les integrines als lligands de la matriu extracel·lular facilita la interacció indirecta amb el citoesquelet d'actina. D'aquesta manera, es promou l'estabilitazció dels fil·lopodis i es fa avançar al con de creixement (Moreland & Poulain, 2022). Les CAMs no només estimulen el creixement de l'axó sinó que també en determinen la direcció. Les CAMs capten de manera directa o indirecta els estímuls atraients o repulsius que dirigeixen la navegació axonal (Moreland & Poulain, 2022). A més de promoure el creixement, les CAMs permeten l'agrupació d'axons en feixos i la fasciculació selectiva gràcies a interaccions homofíliques i heterofíliques. Un exemple són les IgCAMs que regulen les interaccions homotípiques entre axons (Spead & Poulain, 2020). Les protocadherines també medien les interaccions trans-axonals necessàries per la formació dels feixos d'axons (Moreland & Poulain, 2022). A banda de la seva funció adhesiva, les CAMs poden controlar el creixement axonal a partir de canvis en l'expressió de gens. Aquest és el cas de la NCAM1 que en interaccionar amb el receptor FGFR activa la transcripció gènica a través de la via de la MAPK i els factors CREB i c-Fos (Niethammer et al., 2002). Paral·lelament, les integrines, les cadherines, les IgCAMs i les neurexines/neuroligines, entre d'altres, promouen la formació i maduració de l'arbre dendrític (Dityatev et al., 2004; Muller et al., 2010; Sytnyk et al., 2017). La proteïna DSCAM és necessària per al creixement dendrític

i la formació de les ramificacions (Hutchinson et al 2014). Les neurexines/neuroligines participen en l'arborització dendrítica promovent l'estabilització de les estructures (Chen et al., 2010).

Per últim, una de les principals funcions de les CAMs durant el desenvolupament és la formació de les sinapsis. Les CAMs governen el reconeixement entre les membranes pre i postsinàptics, l'establiment inicial de contactes, la construcció dels compartiments, el refinament i el manteniment de les sinapsis (Agustín-Durán et al., 2021; Missler et al., 2012; Moreland & Poulain, 2022; Sanes & Zipursky, 2020; Sytnyk et al., 2017). En l'inici del procés, les diferents combinacions de CAMs en els compartiments sinàptics generen un codi de reconeixement per a l'aperallament sinàptic i l'especificitat de la connexió. Les cadherines i les IgCAMs medien les interaccions trans cel·lulars que possibiliten el reconeixement entre les membranes pre i postsinàptiques (Moreland & Poulain, 2022; Sanes & Zipursky, 2020; Sytnyk et al., 2017). Un cop formades, la interacció trans-sinàptica entre les neurexines i les neuroligines controla diferents propietats de les sinapsis, com per exemple, la composició de receptors de neurotransmissors (Südhof, 2018). Les integrines també faciliten la formació de les sinapsis detectant els senvals de la matriu extracel·lular, per exemple, amb la interacció amb la trombospondina (Christopherson et al., 2005). A més, les CAMs regulen el remodelatge dels compartiments pre i postsinàptics contribuint a la formació de la zona activa i la densitat postsinàptica (Missler et al., 2012). Un exemple són les integrines que controlen el posicionament de receptors i el citoesquelet (Park & Goda, 2016). Quan les sinapsis ja han estat construïdes, les CAMs també regulen la seva eliminació o estabilització durant el procés de refinament (Südhof, 2018; Yamagata et al., 2003). D'una banda, l'activació de les integrines promou l'estabilització dels contactes sinàptics (Duncan et al., 2021). D'altra banda, les L1CAM o NCAM1 regulen el refinament de les espines dendrítiques a través de la interacció amb la Semaforina 3 (Auger, 2020). Les cadherines també poden regular el refinament o la maduració de les espines, en aquest cas, a partir de la unió a les catenines (Bian et al., 2015).

Plasticitat sinàptica

En finalitzar l'establiment i el refinament de les sinapsis en les primeres etapes postnatals, les CAMs vetllen per l'òptim manteniment de les connexions i són partícips dels fenòmens de plasticitat sinàptica durant l'etapa adulta (Dityatev et al., 2004; Muller et al., 2010; Sytnyk et al., 2017). Les CAMs contribueixen a la restructuració dels compartiments sinàptics en resposta a l'activitat (Missler et al., 2012). Les cadherines i les IgCAMs participen en la inducció de la LTP i regulen la formació de noves sinapsis durant els fenòmens de plasticitat a llarg termini (Benson et al., 2000). La N-cadherina estabilitza els canvis estructurals que tenen lloc en les espines dendrítiques en respota a la LTP i també modula la plasticitat presinàptica reduint el reciclatge de les vesícules (Missler et al., 2012; Togashi et al., 2009). La proteïna PSA-NCAM és necessària per a la inducció de la LTP i la LTD a l'hipocamp (Muller et al., 2010b; Sytnyk et al., 2017). Canvis en l'expressió dels membres de la L1CAM també alteren el correcte funcionament de la LTP. Les seves accions estan vehiculades per diferents vies de senyalització en les quals hi ha la CaMKII, el FGFR, la PKC, Fyn o TkrB (Sytnyk et al., 2017).

Neurogènesi adulta

L'interès pel rol de les CAMs en la regulació de la neurogènesi adulta ha incrementat exponencialment en els darrers anys. Les CAMs són elements estructurals dels nínxols neurogènics que proveeixen suport físic a les NSCs. Simultàniament, intervenen en la transmissió dels senvals que regulen la dinàmica de les NSCs adultes (Morante-Redolat & Porlan, 2019). Les NSCs adultes presenten una elevada expressió de gens que participen en l'establiment d'unions entre cèl·lules i en les interaccions amb la matriu extracel·lular. En la part apical de les NSCs, hi trobem unions adherents mediades per la N-cadherina que faciliten l'ancoratge de les cèl·lules a la membrana ependimal. En ratolins mutants de la proteïna, s'observa una proliferació augmentada indicant que la unió a les cèl·lules ependimals mediada per la N-cadherina dona suport físic a les NSCs i regula la seva quiesència (Porlan et al., 2014). Les cèl·lules de la SVZ també expressen diferents nivells de receptors de la matriu extracel·lular, com les integrines, en funció del seu estat mitòtic. Per exemple, les NSCs quiescents (qNSCs; de quiescent *neural stem cells*) expressen baixos nivells de la integrina $\alpha 6\beta 1$, mentre que les IPCs mitòtiques tenen nivells augmentats (Morizur et al., 2018). Les integrines doncs, regulen el manteniment de les cèl·lules mare i la seva proliferació a través de les interaccions amb la matriu extracel·lular (Morante-Redolat & Porlan, 2019). La interacció de les integrines amb el factor TGF\u00d31 podria promoure la proliferació de les cèl·lules i la seva diferenciació a neurones. Membres de les IgCAMs com la L1CAM o la PSA-NCAM, controlen la proliferació de les NSCs i la diferenciació neuronal de les NSCs adultes (Bian, 2013; Bonfanti & Seki, 2021; Gascon et al., 2010). En conjunt, les evidències indiquen que les CAMs contribueixen a la construcció dels nínxols neurogènics i regulen l'estat funcional de les NSCs. Concretament, les anàlisis transcriptòmiques apunten les CAMs com a importants reguladors de l'estat de quiescència de les NSCs adultes (Codega et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Morizur et al., 2018).

3.2 NCAM2

La molècula d'adhesió neuronal 2 (NCAM2) és una glicoproteïna de la superfamília de les immunoglobulines. Coneguda també com a molècula d'adhesió olfactiva (OCAM) o RB8 molècula d'adhesió neuronal (RNCAM), es tracta d'una proteïna de membrana que, juntament amb NCAM1, completa el grup de les NCAM. Les dues NCAM són proteïnes homòlogues que comparteixen estructura i part de les seves funcions. Els grans esforços dedicats a la caracterització de l'estructura i les funcions de NCAM1 contrasten amb la poca informació disponible sobre NCAM2. Tot i així, en els darrers anys ha augmentat l'interès per NCAM2 arran de la seva possible implicació en patologies com la síndrome de Down o la malaltia d'Alzheimer. El tema central d'aquesta tesis és el de determinar les implicacions de la proteïna NCAM2 en la formació del sistema nerviós i els mecanismes de plasticitat neuronal adulta.

3.2.1. El gen

El gen *Ncam2* es troba en el cromosoma 16 en ratolins, a la regió 16C3.3, i conté aproximadament 450 Kb amb un total de 19 exons. En humans, el gen es troba en el cromosoma 21, a la regió 21q21.1, presenta aproximadament 550 kb i un total de 25 exons amb una estructura i organització similars a les del gen murí (**Figura 1.15**). Els dominis del gen *Ncam2* presenten un 45% de similitud amb els del gen *Ncam1* indicant un origen filogenètic comú. El gen també s'ha conservat en altres mamífers i espècies de vertebrats com els peixos zebra. En invertebrats, en canvi, el que trobem són gens els ortòlegs *apCAM* i *Fas2* (Pébusque et al., 1998; Winther et al., 2012).

El gen *Ncam2* s'expressa en diferents teixits però presenta nivells més elevats en el cervell dels mamífers (Paoloni-Giacobino et al., 1997). En ratolins, l'expressió s'inicia entorn el dia E18 i arribar al seu pic en el dia postnatal 21 (Yoshihara et al., 1997). La seva expressió es manté durant l'etapa adulta, fet que podria indicar papers destacats de la proteïnatant en el desenvolupament del NS com en la seva regulació i manteniment en etapes posteriors. Els factors que regulen la expressió del gen no es coneixen amb detall. Els escassos estudis realitzats en cèl·lules citocides naturals (en anglès *natural killer cells*) senyalen que l'expressió de *Ncam2* pot ser activada pels factors de transcripció STAT4 i STAT5. També s'ha descrit la seva activació per part de citoquines com la IL-2 o l'INF-y de manera independent a STAT5 (Nelson et al., 2006). A més, la seqüència del gen conté llocs d'unió del factor de transcripció CTCF, seqüències d'unió a elements potenciadors i punts de cromatina oberta.

Un empalmament alternatiu del gen durant la transcripció dona lloc a dos transcrits o RNAm: un de 6106 parells de bases i un altre de 4898 (Figura 1.15). Aquests dos RNAm donaran lloc a dues isoformes de la proteïna: la NCAM2.1 i la NCAM2.2. El transcrit que codifica per la isorforma NCAM2.1 conté una regió PEST en la seva seqüència associada amb una alta taxa de renovació proteica. Estudis amb ratolins transgènics han suggerit que la presència de 9 motius ATTTA en la regió 3'UTR no codificant de la isoforma NCAM2.2 fan que tingui menys estabilitat. La menor estabilitat es tradueix en nivells més baixos d'expressió i un patró més restringit (Alenius & Bohm, 1997, 2003; Winther et al., 2012; Yoshihara et al., 1997) (Figura 1.15).



Figura 1.15. Localització i estructura del gen Ncam2.

En l'esquema es representa la localització del gen Ncam2 en el cromosoma humà i murí (panell esquerra). En humans, el gen es troba a la regió 21q21.1 del cromosoma 21 mentre que en ratolins es troba a la regió C3.3 del cromosoma 16. A la dreta, es mostra l'estructura d'introns i exons del gen (Ncam2) i les dues isoformes generades per un procés d'empalmament alternatiu (Ncam2.1 i Ncam2.2). En la literatura, s'han descrit quatre transcrits diferents corresponents a la isoforma NCAM2.1 que presenta un domini transmembrana (TM) i un domini citosòlic (DC). De la isoforma NCAM2.2, unida a la membrana per un grup fosfotadilinositol (GPI), s'han detectat dos RNAm. Els * senyalen les posicions de possibles motius desestabilitzadors ATTTA a la regió 3'UTR no codificant. Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida a Yoshihara et al., 1997.

3.2.1 La proteïna

La traducció de l'RNAm origina dues isoformes amb un pes molecular, estructura i localitzacions diferents (Von Campenhausen et al., 1997). La isoforma NCAM2.1 és una proteïna transmembrana de 837 aminoàcids mentre que la isoforma NCAM2.2 és una proteïna de 727 aminoàcids que s'uneix a la membrana a través d'un grup GPI (Alenius & Bohm, 2003; Yoshihara et al., 1997).

L'estructura de l'ectodomini és compartida entre les dues isoformes de NCAM2 i és similar a la de NCAM1. El domini extracel·lular està format per cinc mòduls tipus immunoglobulina (IgI-IgV), seguits per dos dominis fibronectina tipus III (FnIII1-2) (**Figura 1.16**). Anàlisis estructurals han revelat algunes característiques dels enllaços d'unió entre mòduls que podrien tenir implicacions funcionals. Per exemple, les unions entre els mòduls Igs són lineals, però entre el mòdul IgV i el mòdul FnIII1 es forma una corba. A més, els angles entre els mòduls FnIII1-FnIII2, i sobretot, entre els mòduls Ig1-Ig2 són molt flexibles. La part més flexible correspon amb aquesta darrera frontissa entre Ig1-Ig2 a partir de la qual es dona la dimerització de la proteïna (Kiselyov et al., 2003; Kulahin et al., 2011; Kulahin & Walmod, 2010; Winther et al., 2012).

Les diferències entre les dues isoformes es troben en la part intracel·lular de la proteïna. La proteïna NCAM2.1 conté un domini transmembrana i una cua citoplasmàtica a través de la qual pot interaccionar amb proteïnes del citosol. En canvi, la isoforma NCAM2.2 es troba unida a la membrana per un grup GPI fet que fa que tingui una localització i funcions diferents a les de NCAM2.1 (**Figura 1.16**). La isoforma NCAM2.2, gràcies al grup GPI, té una major presència en les regions riques en lípids de la membrana, conegudes com a *lípids rafts*. La localització en aquestes regions podria fer que participés en vies de senyalització i processos diferents als de la NCAM2.1 (Davy et al 1999).

La sequència proteica de la proteïna pot ser sotmesa a modificacions postraduccionals. S'ha descrit la fosforil·lació dels dominis S765, T780 i S786 (Huttlin et al., 2010; Kulahin & Walmod, 2010). També s'ha vist que l'enzim BACE-1 o el β -amiloide poden induir la seva proteòlisi (residus 682 i 701) i provocar l'alliberament de la fracció extracel·lular (Kim et al., 2021; I Leshchyns'Ka et al., 2015). Contràriament a NCAM1, fins ara no s'ha descrit la polisialització de la proteïna.



Figura 1.16. Estructura de NCAM2.

L'estructura de NCAM2 està formada per un domini extracel·lular amb cinc dominis del tipus immunoglobulina (IgI-IgV) i dos dominis del tipus fibronectina (FnIII1-2). En el cas de la isoforma NCAM2.1, presenta un domini transmembrana i una cua citoplasmàtica. La isoforma NCAM2.2 s'uneix a la membrana per un grup glicosilfostadidilinositol (GFP). En el panell dret superior, s'observa la predicció estructural de la proteïna obtinguda l'eina *Alphafold*. En el panell dret inferior, es representa la dimerització de la proteïna amb els dominis IgI-IgII que fan possible les *trans* interaccions homofíliques. Font: elaboració pròpia a partir de la informació recollida a *Kulabin et al., 2011; Yoshibara et al., 1997 i Alphafold*.

3.2.3. Funcions

La proteïna NCAM2 va aparèixer en escena a finals del segle XX en estudis realitzats en el bulb olfactiu del ratolí. Des de llavors, el coneixement sobre la proteïna i les seves funcions han crescut ràpidament, i avui dia, sabem que NCAM2 és clau per a la morfogènesi neuronal o l'establiment de connexions sinàptiques.

Morfogènesi neuronal

Les funcions de la proteïna han estat extensament estudiades en el bulb olfactiu (Alenius & Bohm, 2003; Winther et al., 2012; Yoshihara et al., 1997). El bulb olfactiu processa la informació de l'olor i està especialment desenvolupat en els rosegadors. L'estructura laminar del bulb està composta per diversos tipus neuronals entre els quals hi ha les cèl·lules mitrals i les cèl·lules glomerulars. Les capes de l'epiteli olfactiu presenten una expressió diferencial de les isoformes NCAM2 amb una major presència de NCAM2.1. Els ratolins *knock out* de *Ncam2* perden la correcta segregació d'axons i dendrites en el glomèrul olfactiu (Walz et al., 2006). A més, els explants de l'epiteli olfactiu que expressen NCAM2 tenen un major creixement axonal i fasciculació (Hamlin et al., 2004). En conjunt, la proteïna participa en el creixement i la formació de ramificacions de les dendrites que faciliten la seva agregació; i en l'elongació i fasciculació selectiva de l'axó en neurones de l'epiteli olfactiu (Alenius & Bohm, 2003; Hamlin et al., 2004; Ichinohe et al., 2003; Walz et al., 2006; Winther et al., 2012). La regulació i el manteniment dels compartiments axodendrítics per part de la NCAM2 s'observa també en el còrtex retrospinal (Ichinohe et al., 2003). Addicionalment, la proteïna també és important per a la migració de les interneurones des de la VZ cap el bulb olfactiu seguint la corrent migratòria rostral.

En el còrtex murí, l'activació de NCAM2 augmenta el nombre de fil·lopodis i la llargada de les neurites per mitjà de la modificació dels nivells de calci intracel·lulars i l'activació el complex de la CaMKII (Sheng et al., 2015).

Connectivitat

En capítols anteriors, s'ha constat el paper destacat de les CAMs en la formació de les sinapsis i la connectivitat del sistema. La proteïna NCAM2 s'expressa en les sinapsis on estableix unions trans-homolífiques entre els compartiments pre i postsinàptics (Ichinohe et al., 2003). Durant la formació de les sinapsis, participa en el reconeixement de les membranes pre i postsinàptiques, i estableix interaccions transhomofliques entre els dos compartiments.

En el sistema olfactiu, estudis electrofisiològics no mostren alteracions significatives en transmissió sinàptica excitatòria, però sí una reducció en l'activitat neuronal sincrònica (Borisovska et al., 2011). En canvi, en neurones corticals, canvis en l'expressió de NCAM2 alteren la formació i funció de les sinapsis. En neurones amb alts nivells de NCAM2, un augment en la freqüència de pics de calci en propagació redueix l'estabilitat de les espines dendrítiques i el nombre de sinapsis madures (Sheng et al., 2019). L'activació de NCAM2 modularia el flux de calci a través dels canals de calci dependents de voltatge de tipus L (Sheng et al., 2019).

Neurogènesi

Prèviament, s'ha detallat com les CAMs són reconeguts reguladors de la proliferació i la diferenciació de les NSCs en etapes embrionàries i adultes. La proteïna homòloga NCAM1 indueix la neurogènesi *in vivo* i promou la diferenciació dels precursos en el gir dentat (Boutin et al., 2009; Shin et al., 2002).

Pel que fa a NCAM2, les dades actuals s'han centrat en progenitors de la medul·la espinal. En els ratolins on s'ha eliminat l'expressió de NCAM2, els progenitors de la medul·lula espinal presenten una major proliferació i taxa de renovació. El procés de diferenciació de les neurones, en canvi, no mostra canvis significatius. Els efectes de NCAM2 en l'activació de les NSCs podrien ser vehiculats per receptors d'EGF de manera indirecta (Deleyrolle et al., 2015). Tot i que no hi ha estudis específics sobre la implicació de NCAM2 en la neurogènesi adulta a la SVZ i la SGZ, el gen Ncam2 ha estat detectat en estudis transcriptòmics realitzats amb les diferents poblacions de NSCs (Shin et al., 2015; Morizur et al., 2018).

Estudis de comportament

L'animal *knock-out* de la proteïna fou generat per estudiar les implicacions de la NCAM2 en la connectivitat del bulb olfactiu (Walz et al., 2006). Els ratolins resultants són viables i no presenten greus alternacions en l'estructura del còrtex probablement degut a efectes compensatoris durant el desenvolupament. Els estudis de comportament s'han limitat al bulb olfactiu on s'han detectat alteracions en l'activitat sincrònica dels circuits sense canvis en l'activitat electrofisiològica de les neurones excitadores, i una millorada agudesa olfactiva (Walz et al., 2006). Els estudis amb el model KO no han recollit informació sobre regions com el còrtex i l'hipocamp, de manera que s'ha investigat la possible d'altres processos cognitius relacionats amb aquestes àrees com l'aprenentatge, la memòria o la navegació espacial.

3.2.4. Lligands

Els lligands que interaccionen amb NCAM2 i fan possible el variat ventall de funcions de la proteïna no es coneixen amb detall. La molècula regula l'adhesió cel·lular i la transducció de senyals en gran part gràcies a l'establiment d'interaccions homofíliques en *cis* o *trans*, segons si les unions es fan entre proteïnes de la mateixa cèl·lula o entre cèl·lules veïnes (Kulahin et al., 2011). Tot i que inicialment s'havia suggerit que la dimerització de la proteïna podria ser en els mòduls Ig1-Ig1 per "intercanvi de domini" (en anglès *domain swap*) (Kim K. Rasmussen et al., 2008), models estructurals posteriors apunten que la dimerització és a través dels dominis Ig1-Ig2 de l'ectodomini (Kulahin et al., 2011). La seqüència d'aquests dominis està altament conservada i els models estructurals mostren una dimerització similar en NCAM1 (Winther et al., 2012). Malgrat la relació gènica i les similituds estructurals, però, no s'han descrit interaccions heterofíliques entre elles (Kulahin et al., 2011).

Les unions amb altres proteïnes o lligands no han estat explorades amb profunditat. Els pocs estudis que han abordat la qüestió han descrit interaccions directes o indirectes de l'ectodomini de NCAM2 amb la Proteïna priònica (Prp; de Prionic protein) (Kislinger 2006), el pèptid β-amiloide, l'enzim BACE-1 (de Beta-site amyloid precursor cleaving enzyme 1) o el FGFR (Keable et al., 2022; Leshchyns'Ka et al., 2015; Rasmussen et al., 2018). La proteòlisi de NCAM2 per la β- secretasa BACE-1 en el bulb olfactiu allibera el fragment C-terminal de la proteïna que conté el domini intracel·lular i part del domini extracel·lular. La interacció de l'enzim amb la proteïna resulta en la internalització de BACE-1 de manera que NCAM2 podria estar regulant l'activitat de BACE-1 promovent la seva endocitosi cap a endosomes positius pel marcador Rab11 (Keable et al., 2022; Kim et al., 2021). El β-amiloide també provoca la protèolisi de NCAM2, en aquest cas del domini extracel·lular. La unió del *β*-amiloide a l'estructura extracel·lular de la proteïna indueix el trencament de la fracció extracel·lular, desestabilitzant i disminuint la presència de NCAM2 en les sinapsis. La pèrdua de NCAM2 sinàptica comporta la desestabilització i pèrdua dels contactes sinàptiques fet que podria estar relacionat amb la pèrdua de sinapsis característica de la malaltia d'Alzheimer (I Leshchyns'Ka et al., 2015). L'afinitat de NCAM2 pels receptors de factors de creixement de FGF estaria relacionada amb les seves funcions en la regulació de la proliferació de les cèl·lules mare i la diferenciació neuronal (Deleyrolle et al., 2015; Rasmussen et al., 2018). La unió específica de NCAM2 amb el receptor FGFR es dona via el loop AB del domini FnIII1 i amb un grau menor a través del loop BC del FnIII2. A nivell funcional, la unió amb el receptor estimula el creixement de les neurites. Aquesta interacció és diferent de la que estableix la seva proteïna homòloga, NCAM1, que ho fa a través de les sequències Walker A dels dominis FnIII però de manera dependent d'ATP (Rasmussen et al., 2018).

Les unions de la proteïna amb altres molècules d'adhesió cel·lular o proteïnes de membrana han de ser transduïdes a l'interior de la cèl·lula per desencadenar vies de senyalització que permetin regular el creixement neuronal o la diferenciació. Per exemple, la cua citoplasmàtica de NCAM2.1 promou la formació, el creixement i la ramificació de les neurites a través de Src i regulant els nivells de calci intracel·lulars (Sheng et al., 2015).

3.2.5. Patologies neurològiques

NCAM2 intervé en un catàleg divers de funcions durant el desenvolupament i l'edat adulta que es troben en la base de les funcions cognitives de l'organisme. Estudis genètics i moleculars han revelat com canvis en l'expressió de NCAM2 estan vinculats amb diversos desordres del neurodesenvolupament i malalties neurodegeneratives. Estudis d'associació del genoma han relacionat el gen *Ncam2* amb trastorns del desenvolupament com la síndrome de Marden-Walker o trastorns de l'espectre autista (ASD, *d'Autism Spectrum Disorders*) (Molloy et al., 2005; Niederhoffer et al., 2016; Petit et al., 2015; Scholz et al., 2016). Així mateix,

la seva localització en el cromosoma 21 el converteixen en un dels gens candidat causant de les alteracions neurològiques de la síndrome de Down (Makino & McLysaght, 2010; Paoloni-Giacobino et al., 1997). Tot i que no es troba en la regió crítica, els efectes en el canvi de dosis deguts a una còpia extra del cromosoma 21 podrien afectar al correcte desenvolupament del sistema nerviós contribuint el fenotip de discapacitat intel·lectual.

L'expressió sostinguda de NCAM2 després del naixement indica que la proteïna també és necessària pel manteniment del sistema adult. Diversos estudis genètics han associat el gen *Ncam2* amb la malaltia d'Alzheimer (Han et al., 2010; Kimura et al., 2007). A nivell cel·lular, en mostres de teixit de pacients amb la malaltia d'Alzheimer s'observa una disminució dels nivells de NCAM2 en les sinapsis (Leshchyns'Ka et al., 2015). La reducció dels nivells podria ser induïda pel β -amiloide, tal com s'ha comentat. L'eliminació de NCAM2 de les sinapsis podria comprometre la viabilitat de les connexions i ser la responsable de la pèrdua de sinapsis observada en les primeres etapes de la demència (Leshchyns'Ka et al., 2015; Penzes & VanLeeuwen, 2011; Pham et al., 2010; Scheff & Price, 2003; Selkoe, 2002).

L'estudi en detall de les funcions de NCAM2 en el desenvolupament i la plasticitat neuronal adulta en el còrtex i l'hipocamp poden contribuir a augmentar el coneixement sobre la regulació d'aquests processos per part de les CAMs, i ajudar a comprendre els mecanismes moleculars subjacents a patologies tant prevalents com la malaltia d'Alzheimer.





L'objectiu general del projecte de tesi és determinar les implicacions de la proteïna NCAM2 en el desenvolupament del sistema nerviós i en els fenòmens de plasticitat neuronal adulta. L'estudi s'ha centrat en l'anàlisi de les funcions de NCAM2 en la regulació de la polarització i diferenciació neuronal; així com en els mecanismes de neurogènesi adulta i plasticitat sinàptica. Per això, es van establir els següents objectius específics:

1. Determinar el paper la proteïna NCAM2 en el desenvolupament neuronal.

- 1.1. Determinar les funcions de la proteïna NCAM2 en l'establiment de la polaritat neuronal i la formació de l'axó.
- 1.2. Analitzar les implicacions funcionals de les interaccions de NCAM2 en els mecanismes de polaritat neuronal.

2. Caracteritzar l'interactoma de NCAM2 en etapes postnatals.

- 2.1. Determinar les interaccions de NCAM2 en la regió del còrtex i hipocamp en etapes postnatals per mitjà de l'espectometria de masses.
- 2.2. Validar les interaccions funcionalment significatives de NCAM2 revelades per l'anàlisi proteòmic.

3. Estudiar les funcions de NCAM2 en la regulació de la neurogènesi adulta.

- 3.1. Analitzar l'expressió de NCAM2 en les cèl·lules implicades en el procés neurogènic a la zona subgranular de l'hipocamp.
- 3.2. Determinar l'efecte del silenciament i la sobreexpressió de NCAM2 en la regulació de les RGCs i en la formació de noves neurones en models *in vivo*.
- 3.3. Estudiar la influència de canvis en l'expressió de NCAM2 en la proliferació i diferenciació de les NSCs *in vitro*.

4. Analitzar el paper de la proteïna NCAM2 en els mecanismes de plasticitat sinàptica.

- 4.1. Estudiar l'efecte de la sobreexpressió o el silenciament de NCAM2 en les espines dendrítiques en cultius neuronals d'hipocamp.
- 4.2. Determinar l'efecte de la sobreexpressió i el silenciament de la proteïna en les espines dendrítiques de les neurones granulars del gir dentat en models *in vivo*.
- 4.3. Analitzar les implicacions de NCAM2 en la dinàmica i la motilitat de les espines dendrítiques en cultius organotípics d'hipocamp.







Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia.

Facultat de Biologia Av. Diagonal 645 08028 Barcelona

Informe sobre les publicacions derivades d'aquesta tesi

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. Lluís Pujadas Puigdomènech, professor agregat a la Universitat de Vic – Universitat Central de Catalunya i professor associat a la Universitat de Barcelona, com a codirectors de la Tesi Doctoral de l'Alba Ortega Gascó.

Informen

Que, fruit de la realització del seu projecte de Tesi Doctoral "Anàlisi de les funcions de la proteïna NCAM2 en el desenvolupament i la plasticitat neuronal", la candidata a Doctora Alba Ortega Gascó ha participat activament en l'elaboració de dos articles publicats en revistes internacionals, un article en procés de revisió i un altre en procés d'elaboració:

1. NCAM2 Regulates Dendritic and Axonal Differentiation through the Cytoskeletal Proteins MAP2 and 14-3-3, Cerebral Cortex.

Antoni Parcerisas, Lluís Pujadas, Alba Ortega-Gascó, Bartomeu Perelló-Amorós, Ricardo Viais, Keiko Hino, Joana Figueiro-Silva, Anna La Torre, Ramón Trullás, Sergi Simó, Jens Lüders, Eduardo Soriano. Cerebral Cortex, Volume 30, Issue 6, June 2020, Pages 3781–3799, https://doi.org/10.1093/cercor/bhz342. Factor d'impacte: 5.357.

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

2. New Partners Identified by Mass Spectrometry Assay Reveal Functions of NCAM2 in Neural Cytoskeleton Organization.

Parcerisas A*, Ortega-Gascó A*, Hernaiz-Llorens M, Odena MA, Ulloa F, de Oliveira E, Bosch M, Pujadas L, Soriano E. New Partners Identified by Mass Spectrometry Assay Reveal Functions of NCAM2 in Neural Cytoskeleton Organization. Int J Mol Sci. 2021 Jul 9;22(14):7404. doi: 10.3390/ijms22147404. *Els autors hi han contribuït d'igual manera. Factor d'impacte: 6.208. Aquest article forma part del segon capítol de resultats d'aquesta Tesi Doctoral.

3. Regulation of young adult neurogenesis and neuronal differentiation by Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2).

Ortega-Gascó A*, Parcerisas A*, Hino K, Herranz-Pérez V, Ulloa F, Elias-Tersa A, Bosch M, García-Verdugo JM, Simó S, Pujadas L, Soriano E. *Els autors hi han contribuït d'igual manera.

Article en preparació, enviat a la revista Cerebral Cortex i actualment, en procés de resposta als revisors.

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

4. Unravelling the role of NCAM2 in synaptic plasticity.

Ortega-Gascó A*, Parcerisas A*, Bosch M, Pujadas L, Soriano E. *Els autors hi han contribuït d'igual manera.

Article en procés d'elaboració per ser enviat.

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

La doctoranda Alba Ortega Gascó ha participat activament en la realització de totes les publicacions. En el primer article, part dels resultats foren prèviament presentats en la tesis Parcerisas, A., 2017. La contribució específica de l'Alba Ortega fou la realització i anàlisi dels experiments de morfogènesi neuronal en la formació de l'axó i els experiments de rescat del fenotip amb la CaMKII. També va participar de manera activa en els estudis proteòmics.

En el segon article, els resultats de l'espectrometria de masses i l'anàlisi bioinformàtic foren prèviament incorporats a la tesis Parcerisas, A., 2017. L'Alba Ortega com a primera coautora de l'article, ha participat en el disseny i la realització dels experiments, ha contribuït destacadament en la realització de l'anàlisi d'espectrometria de masses i ha dut ha terme els experiments de validació de les interaccions. Finalment, ha sigut partícip del muntatge de les figures, l'escriptura i la revisió de l'article.

En la resta d'articles, ha contribuït en qualitat de primera autoria en el conjunt de l'article incloent-hi el disseny i la realització dels experiments, l'obtenció de les imatges, l'anàlisi dels resultats, el muntatge de figures, l'escriptura i la revisió. Aquests articles són originals i no formen part d'altres tesis doctorals. Les conclusions d'aquesta tesi fan èmfasi en les parts dels articles en les quals la doctoranda ha tingut una responsabilitat destacada.

I per tal de que consti per a la presentació de la Tesi Doctoral de l'Alba Ortega Gascó, firmen el present informe.

maus

Eduardo Soriano García

AAAA

Lluís Pujadas Puigdomènech



"It is imperfection - not perfection - that is the end result of the program written into that formidably complex engine that is the human brain, and of the influences exerted upon us by the environment and whoever takes care of us during the long years of our physical, psychological and intellectual development"

Rita Levi-Moltalcin
NCAM2 Regulates Dendritic and Axonal Differentiation through the Cytoskeletal Proteins MAP2 and 14-3-3

Antoni Parcerisas^{1,2,3}, Lluís Pujadas^{1,2,3}, Alba Ortega-Gascó^{1,2,3}, Bartomeu Perelló-Amorós^{1,2,3}, Ricardo Viais⁴, Keiko Hino⁵, Joana Figueiro-Silva^{2,6}, Anna La Torre⁵, Ramón Trullás^{2,6}, Sergi Simó⁵, Jens Lüders⁴, Eduardo Soriano^{1,2,3,7}

¹ Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunulogia, Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

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

³ Institut de Recerca de la Vall d'Hebrón (VHIR), 08035, Barcelona, Espanya.

⁴ Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB Barcelona), Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), 08028, Barcelona, Espanya.

⁵ Department of Cell Biology and Human Anatomy, University of California, Davis, CA 95616, USA.

⁶ Unitat de Neurobiologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC, IDIBAPS, 08036, Barcelona, Espanya.

⁷ Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA) Academia, 08010, Barcelona, Espanya.

RESUM

La Molècula d'Adhesió Neuronal 2 (NCAM2; de *Neural Cell Adhesion Molecule 2*) està implicada en el desenvolupament i la plasticitat del sistema olfactiu. Anàlisis genètiques han relacionat el gen *Neural* amb desordres del desenvolupament com la síndrome de Down i l'autisme, tot i així el seu paper en el desenvolupament cortical és desconegut. En aquest estudi, es mostra com el silenciament de la proteïna compromet l'arquitectura dendrítica, produint un fenotip aberrant que es

caracteritza per la formació d'arbres dendrítics més curts, la retracció de les dendrites i l'aparició de nombrosos processos somàtics. La sobreexpressió de la proteïna, en canvi, no provoca alteracions marcades en la morfologia de la neurona. A més, les nostres dades també revelen alteracions en la ramificació de l'axó i dèficits en la polarització neuronal. Els estudis *in vivo* confirmen el fenotip observat *in vitro* i revelen el paper de la NCAM2 en la regulació de la migració cortical. Els experiments de proteòmica i biologia cel·lular revelen que la NCAM2 exerceix les seves funcions a través de complexes proteics amb les proteïnes associades al citoesquelet com la MAP2 , la 14-3-3 γ i la 14-3-3 ζ . Les dades aportades evidencien que la disminució de NCAM2 provoca una desestabilització de la xarxa de microtúbuls i una reducció de la intensitat de la MAP2. Els nostres resultats demostren que la NCAM2 regula la formació i manteniment de les dendrites, la polarització i la migració de les neurones a través de la interacció amb proteïnes associades als microtúbuls.

Aquest article ha estat publicat a la revista Cerebral Cortex, 18 de maig de 2020.

Parcerisas A, Pujadas L, Ortega-Gascó A, Perelló-Amorós B, Viais R, Hino K, Figueiro-Silva J, La Torre A, Trullás R, Simó S, Lüders J, Soriano E. NCAM2 Regulates Dendritic and Axonal Differentiation through the Cytoskeletal Proteins MAP2 and 14-3-3. Cereb Cortex. 2020 May 18;30(6):3781-3799. doi: 10.1093/cercor/bhz342. PMID: 32043120; PMCID: PMC7233011.

Cerebral Cortex, June 2020;30: 3781-3799

doi: 10.1093/cercor/bhz342 Advance Access Publication Date: 10 February 2020 Original Article

ORIGINAL ARTICLE

NCAM2 Regulates Dendritic and Axonal Differentiation through the Cytoskeletal Proteins MAP2 and 14-3-3

Antoni Parcerisas^{1,2,3}, Lluís Pujadas^{1,2,3}, Alba Ortega-Gascó^{1,2,3}, Bartomeu Perelló-Amorós^{1,2,3}, Ricardo Viais⁵, Keiko Hino⁶, Joana Figueiro-Silva^{2,7}, Anna La Torre⁶, Ramón Trullás^{2,7}, Sergi Simó⁶, Jens Lüders⁵ and Eduardo Soriano^{1,2,3,4}

¹Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, and Institute of Neurosciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031, Madrid, Spain, ³Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), 08035, Barcelona, Spain, ⁴Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA) Academia, 08010, Barcelona, Spain, ⁵Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), 08028, Barcelona, Spain, ⁶Department of Cell Biology and Human Anatomy, University of California, Davis, CA 95616, USA, and ⁷Neurobiology Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC, IDIBAPS, 08036, Barcelona, Spain

Address correspondence to Eduardo Soriano. Email: esoriano@ub.edu; Lluís Pujadas. Email: lluis.pujadas@ub.edu

Abstract

Neural cell adhesion molecule 2 (NCAM2) is involved in the development and plasticity of the olfactory system. Genetic data have implicated the NCAM2 gene in neurodevelopmental disorders including Down syndrome and autism, although its role in cortical development is unknown. Here, we show that while overexpression of NCAM2 in hippocampal neurons leads to minor alterations, its downregulation severely compromises dendritic architecture, leading to an aberrant phenotype including shorter dendritic trees, retraction of dendrites, and emergence of numerous somatic neurites. Further, our data reveal alterations in the axonal tree and deficits in neuronal polarization. In vivo studies confirm the phenotype and reveal an unexpected role for NCAM2 in cortical migration. Proteomic and cell biology experiments show that NCAM2 molecules exert their functions through a protein complex with the cytoskeletal-associated proteins MAP2 and 14-3-3 γ and ζ . We provide evidence that NCAM2 depletion results in destabilization of the microtubular network and reduced MAP2 signal. Our results demonstrate a role for NCAM2 in dendritic formation and maintenance, and in neural polarization and migration, through interaction of NCAM2 with microtubule-associated proteins.

Key words: dendritogenesis, MAP2, microtubules, NCAM2, neuronal differentiation, 14-3-3

Introduction

The precise regulation of neuronal migration and morphogenesis, including polarization, branching and maturation of dendrites, axonal outgrowth, and synaptogenesis, is essential for correct brain development (Namba et al. 2015). Within these different steps, the correct transduction of extracellular and

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

membrane bound signaling proteins is essential to stereotyped cytoskeletal rearrangement and dynamics that ultimately lead to the sustaining or destabilization of these processes (Dent et al. 2011; Takano et al. 2015; Kon et al. 2017; Schelski and Bradke 2017). Among these molecules, cell adhesion molecules (CAMs) play a fundamental role (Missaire and Hindges 2015; Sytnyk et al. 2017; Zinn and Ozkan 2017).

The mammalian NCAM family has two members, NCAM1 and NCAM2 (Pebusque et al. 1998; Makino and McLysaght 2010). The two proteins bear a similar ectodomain with five immunoglobulin domains and two fibronectin type III domains, the latter responsible for binding with fibroblast growth factor receptor (FGFR) (Kiselyov et al. 2003; Rasmussen et al. 2018). NCAM1 has three different isoforms (180, 140, and 120 KDa), and NCAM2 has two isoforms: NCAM2.1 bearing transmembrane and cytoplasmic domains and the shorter NCAM2.2 isoform, which is GPI-anchored (Alenius and Bohm 1997; Yoshihara et al. 1997).

While NCAM1 has been extensively studied, playing a fundamental role in neuronal migration, neurite development and synaptogenesis, and adult plasticity (Jorgensen and Bock 1974; Angata et al. 2007; Muller et al. 2010; Sheng et al. 2013; Leshchyns'ka and Sytnyk 2016), NCAM2 is known to be widely expressed in the central nervous system (CNS), although investigation has been focused on the olfactory system where it is important for the formation and maintenance of dendritic and axonal compartmentalization (Alenius and Bohm 1997; von Campenhausen et al. 1997; Kulahin and Walmod 2010; Winther et al. 2012). Furthermore, the role of NCAM2 in other CNS regions remains largely unknown. Only recently, it has been shown that in the cerebral cortex NCAM2 regulates neurite outgrowth and synapse formation via Src and local calcium spikes (Sheng et al. 2015, 2018) and that at later stages it plays a role in synapse maintenance (Leshchyns'ka et al. 2015).

Genetic analyses provide evidence that deletions and single nucleotide polymorphism in the NCAM2 gene are found in patients with autism spectrum disorder (Molloy et al. 2005; Hussman et al. 2011; Scholz et al. 2016) and in disorders linked to abnormal neurodevelopment (Petit et al. 2015). Moreover, NCAM2 has been proposed as a candidate for the intellectual disability phenotype in Down syndrome since the NCAM2 gene is located on chromosome 21 (Paoloni-Giacobino et al. 1997; Winther et al. 2012). Taken together, these data suggest a relationship of NCAM2 with cortical brain development, although the molecular and cellular mechanisms involved are poorly understood.

In this study, we investigated the role of NCAM2 in neuronal differentiation and morphogenesis using gain- and loss-offunction approaches to modulate NCAM2 expression both in vitro and in vivo. We found that NCAM2 depletion has dramatic effects on neurite development and polarization, with retraction of dendritic arbors and increased numbers of primary dendrites with aberrant morphology and dynamics. These observations were confirmed in vivo, and we were also able to demonstrate the role of NCAM2 in cortical neuronal migration. Furthermore, proteomic, biochemical, and functional rescue experiments provide evidence that NCAM2 exerts the above functions at least in part by modulating microtubule dynamics and by interacting with the microtubule-associated protein MAP2 and some 14-3-3 protein family members. These data reveal novel functions of NCAM2 protein in neural development through a previously unknown NCAM2/cytoskeletal protein complex.

Materials and Methods

All experimental procedures were carried out following the guidelines of the Committee for the Care of Research Animals of the University of Barcelona, in accordance with the directive of the Council of the European Community (2010/63 y 86/609/EEC) on animal experimentation. 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).

Animals and Cell Lines

Hippocampal neurons were obtained from E15-17 CD1 mouse embryos. Brains were dissected in PBS containing 3% glucose, and hippocampi were excised. After trypsin (GIBCO) and DNAse (Roche Diagnostics) treatments, hippocampi were dissociated with gentle sweeping. Cells were counted and seeded onto poly-D-lysine-coated dishes 10^5 cells/cm² or 2×10^4 cells/cm² for low-density cultures. Cells were plated in neurobasal medium containing 2% B27 supplement (GIBCO), penicillin/streptomycin (Life technologies), and Glutamax (Life technologies) and conditioned media from matured glia culture. HEK293T cell lines were grown in DMEM containing 10% FBS (Life technologies) and penicillin/streptomycin (Life technologies). All cells were kept at 37° C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Antibodies and Reagents

The following commercial primary antibodies were used for immunohistochemistry: anti-GFP (A11122, Invitrogen, 1:2000); anti-ChFP (ab167453, Abcam, 1:300); anti-MAP2 (MA1406, Sigma, 1:2000); anti-NCAM2 (AF778, R&D Systems, 1:250); anti-NCAM2.1 (EB06991, Everest, 1:250); anti-Neurofilament (837 904 SMI-312, Biolegend, 1/300); anti-acetylated α -tubulin (T6793, Sigma, 1/50000); anti-detyrosinated α -Tubulin (AB3201, Sigma, 1/200); and anti- β -III-tubulin (801 201, Biolegends, 1/2500). For western blot (WB), we used anti-NCAM2 (AF778, R&D Systems, 1:500); anti-actin (MAB1501, Chemicon, 1:5000); anti-GFP (A11122, Invitrogen, 1:2000); anti-MAP2 (M9942 clone HM-2, Sigma, 1:1000); anti-14-3-3 (1657, SantaCruz, 1:2000); and anti-Tau (3-repeat isoform RD3, 05-803, Sigma, 1:1000). Alexa Fluor fluorescent secondary antibodies were from Invitrogen. To counterstain nuclei, the tissue and cells were incubated in 2-(4-amidinophenyl)-1Hindole-6-carboxamidine (DAPI, D-6564, Sigma, 1:1000). For actin staining, the cells were incubated in phalloidin-TRICT (P-1951, Sigma, 1:200). Biotinylated secondary antibodies were from Vector Labs; streptavidin-biotinylated/HRP complex and ECL were from GE Healthcare. The HRP-labeled secondary antibodies used for WB were from DAKO. Diaminobenzidine reagent (DAB) and Eukitt mounting media were from Sigma-Aldrich. Mowiol was from Calbiochem. BCA protein assay was from Thermo Fisher.

Plasmids

The target sequences for depletion of both Ncam2 isoforms were GCACCTGGACATCGAATAT (ShNcam2N) and GAAGGTACAGGGA-AATAAA (ShNcam2), corresponding to nucleotides 1395-1414 and 2142-2161, respectively, of mouse Ncam2 mRNA. The ShN cam2 sequence was 5'-CGCGTCCCCGAAGGTGCAGGGAAATAA-ATTCAAGAGATTTATTTCCCTGCACCTTCTTTTTGGAAAT-3'; the ShNcam2N sequence was 5'-CGCGTCCCCGCACCTGGACATCGA-ATATTTCAAGAGAATATTCGATGTCCAGGTGCTTTTTGGAAAT-3'; and the ShCnt sequence was 5'-GATCCCCGCAGTGCAATATC-GGAAACTTCAAGAGAGTTTCCGATATT-GCACTGCTTTT-3. They were cloned into pLVTHM within the MluI and ClaI sites (Plasmid #12247, #Addgene).

The cDNA of Ncam2.2 was amplified with 5'-ACTGGAATTC-GTGGCAGCGGAAGGTTCTC-3' and 5'-ACTGTCTAGAAATTCAG-GGGGAAGGCGAAT-3' from pCR4-TOPO (Mouse Ncam2 cDNA, ABIN4003230) and cloned into pCDNA3.1 (Addgene) using EcoRI/XbaI sites, pCNcam2.2. The c-terminal of Ncam2.1 cDNA was amplified with 5'-ACTGGAATTCGTGGCAGCGGAAGGTTCTC-3' and 5'-GTGGCTAGAGAAGAAGAAGGTAC-3' from hippocampal mRNA and cloned into pCNcam2.2 using PstI/XbaI sites, pCNcam2.1.

The cDNA of Ncam2.1 was amplified with 5'-ACCATGAGCC-TCCTCCTCCC-3' and 5'-CTGACCAAGGTGCTGAAACT-3'and cloned into pWPI (Plasmid #12254, Addgene) within PmeI site. The cDNA of Ncam2.2 was amplified with 5'-ACCATGAGCCTC-CTCCTCTCC-3' and 5'-TCTCTGATCAGGGAGTACCA-3' and cloned into pWPI (Plasmid #12254, Addgene) within PmeI site.

For the rescue experiment, pCNcam2.1 and pCNcam2.2 vectors were amplified using PCR reaction (QuickChange II, Agilent Technologies); in the first reaction with 5'-AGAGAAGAAGGTAC-AGGGAAACAAGGACCATTATCTTGGAGC-3' and 5'-AGATCA-GTGGCTAGAGAAGAAAGTTCAGGGTAACAAGGACCA-3' and the second reaction with 5'-GCTCCAAGATAATGTGGTCCTTGTTT-CCCTGTACCTTCTTCTCT-3' and 5'-GATAATGTGGTCCTTGT TACCCTGAACTTTCTTCTCTAGCCACTGATCT-3', Mt-NCAM2.1 and Mt-NCAM2.2 were obtained.

CamKII α -mCherry and CamKII β -mCherry were a generous gift from Miquel Bosch (IDIBAPS, Institute for Research in Biomedicine August Pi i Sunyer). MAP2B-GFP and MAP2C-GFP plasmids were a generous gift from Casper Hoogenraad (University of Utrecht) (Farah et al. 2005; Gumy et al. 2017).

Neuronal Culture Treatments

Hippocampal cultures were transfected at 3 days in vitro (DIV) using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions; cultures were fixed at 7 DIV for analysis of neuronal morphology. In MT-stabilization experiments, hippocampal cultures were treated at 4 DIV with 3 μ M Taxol (Sigma) or DMSO for 72 h and fixed for analysis of neuronal morphology. In FGFR inhibition experiments, hippocampal cultures were treated at 4 DIV with 3 μ M Taxol (Sigma) or DMSO for 72 h and fixed for analysis of neuronal morphology. In FGFR inhibition experiments, hippocampal cultures were treated at 4 DIV with 25 μ M PD173074 (Sigma) or DMSO for 72 h and fixed for analysis of neuronal morphology. To perform live-imaged of EB3-labeled comets, cultures were transfected at 4 DIV. The HEK293T cells were transfected with Lipofectamine Plus (Life Technologies) according to the manufacturer's instruction.

Immunoprecipitation Mass Spectrometry and Western Analysis

Brains were dissected from P12–P15 and P3 mice for the mass spectrometry experiment and the western blotting, respectively. Hippocampus and cortex regions were homogenized in isotonic buffer (Tris 10 mM a pH 7.4, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EGTA 1 mM) and protease inhibitors (Complete, Roche), using a polytron. Membrane fraction was selected by centrifugation at 15 000 rpm for 15 min at 4° C and the supernatant was discarded. Membrane fraction was homogenized in lysis buffer (Hepes 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% glycerol, and 1% Triton X-100) in orbital agitation for 45 min. The supernatant was selected by centrifugation at 15 000 rpm for 15 min at 4°C.

For the mass spectrometry, the magnetic beads (Dynabeads Antibody Coupling Kit, Lifetechnologies) were conjugated with an antibody against Ncam2.1 (EB06991, Everest) or against both Ncam2 isoforms (AF778, R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. Membrane fraction supernatant was incubated with the magnetic beads o/n at 4°C. After washing with lysis buffer three times, the proteins were eluted by 30 µL Urea buffer (urea 8 M, Tris 50 mM a pH 7.5, DTT 60 mM) for 15 min at room temperature (RT). The samples were processed and analyzed at the Proteomic facility of UB (CCiTUB, Cientific Parc of Barcelona). Briefly, the samples were digested with trypsin (2 µg, pH 8, 32.5°C, o/n). Peptides were separated (HPLC NanoAcquity, Waters) and detected (Orbitrap Velos, Thermo Scientific), with resolution of 60 000, ratio 400 m/z, and acquisition 300–1800 m/z. Protein lists were obtained with FDR \leq 0.01%. String 10.0 was using for the bioinformatics analysis.

For immunoprecipitation and western blotting, membrane fraction supernatant was incubated with 2 µg of antibodies overnight (Anti-NCAM2 [AF778, R&D Systems]; Anti-NCAM2.1 [EB06991, Everest]; Anti-MAP2 [M9942 clone HM-2, Sigma], and Anti-14-3-3 [1657, SantaCruz]). Protein G-Sepharose beads (GE Healthcare) were added for 2 h. After washing with lysis buffer, the proteins were eluted by boiling in 20 µL of loading buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8; 2.15 M β -mercaptoethanol; 10% SDS; 30% glycerol; and 0.012% bromophenol blue), boiled for 5 min at 95°C, and processed for WB.

Immunofluorescence Microscopy

Cultured neurons and cell lines were fixed in PBS 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at RT. In the analysis of fluorescence intensities, neuronal cultures were simultaneously permeabilized and fixed in 4% PFA/4% sucrose/0.25% glutaraldehyde/0.1% Triton X-100 diluted in PHEM buffer (60 mM Pipes, 25 mM Hepes pH 7.4, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂) as previously described (Sanchez-Huertas et al. 2016). Cells were permeabilized with PBS 0.1% Triton X-100 for 5 min, blocked with 10% serum, and incubated in 5% serum overnight with primary antibodies. Images or mosaics for dendritic and axonal parameters (number of primary dendrites, branching, total length or longest length) and Sholl analysis were taken with an inverted microscope AF6000 (Leica Microsystem) equipped with a 20× objective (1344 imes 1024 pixel resolution). For analysis of neuronal stainings, single-plane images of somatodendritic regions were acquired with an inverted confocal Leica TCS SP5 microscope (Leica) equipped with a 63×/1.40 Oil objective (1344 \times 1024 pixel resolution).

In Utero Electroporation

In utero microinjection and electroporation were performed at E14.5 essentially as described (Simo 2010), using timed pregnant CD-1 mice (Charles River Laboratories). Briefly, DNA solutions (pCAG-EGFP and a short-hairpin RNA [shRNA] against the indicated gene) were mixed in 10 mM Tris (pH 8.0) with 0.01% Fast Green. Needles for injection were pulled from Wiretrol II glass capillaries (Drummond Scientific) and calibrated for 1 µL injections. Forceps-type electrodes (Nepagene) with 5 mm pads were used for electroporation (five 50 ms pulses of 45 V at E14.5). Embryos were collected at E19.5. Brains were dissected and successful electroporations identified by epifluorescence microscopy. Positive brains were fixed in 4% formalin/PBS and cryoprotected in 30% sucrose/PBS overnight at 4°C. Brains were frozen in O.C.T. compound before 14-µm-thick brain crosssections were obtained with a cryostat and placed on slides. Sections were antigen-retrieved by immersion of the slides in 0.01 M sodium citrate buffer, pH 6.0, at 95°C for 20 min. Sections were blocked for 2 h with 10% normal goat serum (NGS), 10 mM glycine, and 0.3% Triton X-100 in PBS at RT. Primary antibodies (anti-GFP) were incubated overnight at 4°C. Slides were washed four times for 10 min in 0.1% Triton X-100/PBS. Secondary antibodies were added for 2 h at RT. Slides were washed as before and coverslipped with Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes). Most images were obtained with epifluorescent illumination and $10 \times$ objective (Leica 760). Positions of GFP-positive neurons were recorded from several sections per embryo. Data were collected from the lateral part of the anterior neocortex. The cortex was divided into "bins" as follows: The distance from the pial surface to the bottom of the SVZ was measured and divided into 10 equal-sized bins. The percentage of GFP-labeled neurons in each bin for each embryo was then calculated. The graphs plot the mean and standard error of % neurons in each bin for the N embryos in a group. These values were also averaged across the N embryos in a group. P values are from two-way ANOVA, Bonferroni comjparison post hoc test.

Western Blot

Mice were sacrificed by decapitation and the brain was quickly removed from the skull. The brain was dissected into different brain regions (hippocampus, cortex [anterior and posterior], cerebellum, striatum, and olfactory bulb), which were frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C until use. Brains were homogenized in lysis buffer (Tris base 125 mM and 2% SDS) using a polytron. Samples were frozen, 5 min in dry ice, and unfrozen, 2 min at 45°C, for three times. Samples were sonicated for 30 s in 0.5 cycles and 80% of amplitude and centrifuged to remove insoluble debris. Supernatant was collected and stored at -20° C until use. For the cell culture, lysates were prepared with lysis buffer at 95°C and processed as brain samples.

Samples were resolved by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1 h at RT in TBST (Tris 10 mM [pH 7.4], sodium chloride 140 mM [TBS] with 0.1% Tween 20) containing 5% nonfat milk. Primary antibodies were incubated for 90 min in TBST-0.02% azide. After incubation with Horseradish Peroxidase (HRP)-labeled secondary antibodies for 1 h at RT in TBST, membranes were developed with the ECL system (GE Healthcare).

Histological Staining

Animals were anesthetized and perfused for 20 min with PBS 4% PFA. Brains were removed, post-fixed overnight with PBS 4% PFA, cryoprotected with PB-30% sucrose, and frozen. Brains were sectioned coronally (30 µm) and sections were blocked for 2 h at RT with PBS containing 10% NGS and 0.2% gelatin. Primary antibody was incubated overnight at 4°C with PBS-5% NGS. For immunohistofluorescence, sequential incubation was with a secondary antibody (AlexaFluoro, Invitrogen), and the sections were mounted (Mowiol, Calbiochem). For immunohistochemistry, sequential incubation with biotinylated secondary antibody (2 h at RT) and streptavidin-HRP (1:400; 2 h at RT) was performed in PBS-5% NGS; bound antibodies were visualized by reaction using DAB and $\rm H_2O_2$ as peroxidase substrates; the sections were dehydrated and mounted (Eukitt).

Neuron Time Course and Time-Lapse Microscopy

Hippocampal cultures were plated in gridded glass bottom dishes (35 mm dish/No. 1.5 gridded coverslip/14 mm glass diameter, MatteK) and transduced at 3 DIV with shRNAs and pEGFP-N3, ratio 1:3. Beginning 1 day after transfection, neurons were imaged every 24 h using an Olympus IX81 microscope equipped with Yokogawa CSU-X1 spinning disc and a temperature controlled CO_2 incubation chamber. Image stacks were acquired with a $60 \times / 1.4$ Oil immersion objective and an iXon EMCCD Andor DU-897 camera, using iQ2 software. At 7 DIV, images were taken at 30-s interval for 30 min. Cultures were fixed and immunostaining was performed, using the previously described protocols. Immunofluorescence images were taken with an Olympus CellR-Xcellence inverted microscope equipped with a Hamamatsu Orca-ER camera with a $60 \times / 1.42$ Oil objective.

Comet Time-Lapse Microscopy

Live imaging of EB3-labeled comets was carried out as previously described (Sanchez-Huertas et al. 2016). Briefly, hippocampal cultures were plated in glass bottom dishes (MatTek) transduced at 4 DIV with shRNAs and EB3-Tomato and imaged 48 h later. Live imaging of EB3 comets and of mitochondria was performed in the dendrite and/or within the proximal axons of random transfected cells, using an Olympus IX81 microscope equipped with Yokogawa CSU-X1 spinning disc and a temperature-controlled CO₂ incubation chamber. Image stacks were acquired with a 100×/1.4 Oil immersion objective and an iXon EMCCD Andor DU-897 camera, using iQ2 software. Fluorescent images with a pixel size of 0.14 µm were taken at 1-s interval for 2.5 min.

Image Analysis

All images were processed and quantified using the ImageJ software (NIH). Axonal and dendritic EB3 comet analysis was made using the kymograph macro (ImageJ software), with lines drawn on the trajectories of comets. The average fluorescence intensity staining (β -tubulin, acetylated α -tubulin, detyrosinated α -tubulin, MAP2, and actin) was measured within the somatodendritic area delimited by the GFP signal. Whole axon and dendrite length were measured using the NeuronJ macro (ImageJ software).

Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using the Prism 5 software. Two-tailed unpaired t-tests or analysis of variance tests were performed to compare the experimental groups.

Results

NCAM2 Is Widely Expressed during Brain Development

We first investigated the pattern of NCAM2 expression in the developing and adult brain. At adult stages, NCAM2.1 and NCAM2.2 isoforms were detected in most of the regions analyzed by WB, with the expression of NCAM2.1 protein being higher (Supplementary Fig. 1A). In the developing cerebral cortex (including hippocampus), the expression of both isoforms increased progressively, again with higher levels for



Figure 1. NCAM2 overexpression does not alter dendritic and axonal arborization. (A) Immunostaining detection of NCAM2 and the reporter gene GFP in primary hippocampal neurons transfected with the overexpression plasmids NCAM2.1 OE and NCAM2.2 OE or the control plasmid. Arrowheads point to neurons transfected with control and overexpression plasmids. NCAM2-specific signal is increased upon individual overexpression of both isoforms in transfected neurons. (B) Low magnification of GFP labeling shows the whole dendritic and axonal arborization in transfected neurons. (C) Sholl analysis of the dendritic tree of neurons transfected with NCAM2 and control vectors does not reveal significant differences between conditions. (D, E) Quantification of dendritic (D) and axonal (E) arborization parameters (i.e., number of primary dendrites, total dendritic and axonal tree lengths, longest dendrite and axon lengths, and density of branching points in dendrites and axon) in neurons with NCAM2.1 OE, NCAM2.2 OE, and in control transfection. Only NCAM2.1 overexpression induces a slight decrease of the longest axonal length in hippocampal neurons. For the analysis of aconal parameters, N = 28, N = 30, and N = 28 neurons from three independent experiments were analyzed for Control, NCAM2.1 OE, and NCAM2.2 OE. Tespectively. For the analysis of axonal parameters, n = 17, n = 18, and n = 19 neurons were analyzed, respectively. For Control, NCAM2.1 OE, and NCAM2.2 OE. Data are represented as mean $\pm 5EM$; $^{*}P < 0.05$; one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison post hoc test. Scale bars: (A) 20 µm; (B) 50 µm.

the NCAM2.1 isoform (Supplementary Fig. 1B). Immunohistochemistry showed that at early embryonic stages (E14), NCAM2 protein was mainly expressed in the marginal zone, subplate, and ventricular zone, as well as in some fiber systems. At perinatal stages, the staining increased and was particularly high in cortical pyramidal neurons and in several plexiform layers. From P15 onward, NCAM2 expression was enriched in the cortical neuropil (Supplementary Fig. 1C). The pattern of NCAM2 expression was confirmed by in situ hybridization studies (Supplementary Fig. 1D–F). We thus concluded that NCAM2 protein is widely expressed in both the developing and adult brain.

NCAM2 Is Required for Proper Neuronal Morphogenesis

To better understand the role of NCAM2 in neuronal differentiation, we altered the expression of ncam2 in hippocampal cultures by inducing the overexpression of NCAM2 isoforms during stage 4 of Banker in vitro development (Bentley and Banker 2016). The increased levels of NCAM2 expression in transfected cells, identified by the reporter gene GFP, were confirmed by immunolocalization (Fig. 1A). We found that the overexpression of both the NCAM2.1 and NCAM2.2 isoforms did not substantially alter neuronal polarization or the overall morphology of axons and dendrites compared to controls (Fig. 1A-C). Indeed, quantification of the dendritic and axonal compartments showed similar numbers of primary dendrites, distribution of branching points, and total extension of dendritic and axonal arbors in all conditions (Fig. 1D,E). We found only a slight reduction in the length of the longest axonal branch and a tendency toward change in axonal branching frequency (Fig. 1E). We thus concluded that the overexpression of NCAM2 does not result in marked neuronal morphologic alterations in dendrites or axons.

We next performed knockdown experiments using Ncam2specific shRNA (ShNcam2) to silence simultaneously the expression of both NCAM2.1 and NCAM2.2 isoforms. We first corroborated that the designed ShNcam2 decreased NCAM2.1 and NCAM2.2 protein levels by 81% in transfected cell lines, while scramble shRNA (ShCnt) did not alter NCAM2 levels (Supplementary Fig. 2A-D). In neuronal cultures, NCAM2 expression levels were also dramatically reduced by ShNcam2, as determined with immunocytochemistry (Fig. 2A). We found that knockdown of NCAM2 protein led to dramatic alterations in the morphology and overall organization of the neuritic tree of the transfected hippocampal neurons (Fig. 2A,B). The most prominent alteration in NCAM2-silenced neurons was a marked increase in the number of primary dendrites with a decrease in the maximum lengths of individual dendrite tracts arising from cell somas and an overall reduction in total dendritic tree length (Fig. 2B); dendritic alterations were supported by Sholl analysis (Fig. 2B). Similar branching alterations were found in axons, although the total axonal extension was not altered (Fig. 2C,D). Also, we found that about 20% of NCAM2-silenced neurons displayed two or more neurites with the morphological characteristics of axons (see the example in Fig. 2C, right panel). In addition to the fact that these processes were of constant, thin diameter and considerably longer than dendrites, immunocytochemical studies revealed that they were positive for Tau (an axonal marker) (Supplementary Fig. 3A). Live imaging tracking experiments (EB3 comets; Supplementary Fig. 3B, see also Fig. 7) in two neurons demonstrated that a large percentage of their microtubule-associated comets had an anterograde orientation (Supplementary Fig. 3B; range 71-100%). Thus, these findings indicate that these two processes are axonal-like in nature.

Taken together, our results show that NCAM2 protein is necessary for the correct differentiation and morphogenesis of the dendritic and axonal compartments and suggest that this adhesion protein may also be involved in neuronal polarization.

NCAM2.1 and NCAM2.2 Isoforms Cooperate in Dendrite Development

In order to identify the NCAM2-isoform(s) responsible for the dendritic and axonal alterations described above, we performed rescue experiments by coexpressing the ShNcam2 sequence and ncam2.1- or ncam2.2-harpin-resistant cDNAs (Mt-NCAM2.1 and Mt-NCAM2.2). The specificity of this approach was tested in cell lines cotransfected with shRNA- and cDNA-expressing vectors (Fig. 3A). Our results confirmed that ShNcam2 does not alter the expression of either Mt-NCAM2.1 or Mt-NCAM2.2 as expected (Fig. 3A). Then, we cotransfected hippocampal cultures with ShNcam2 and Mt-NCAM2.1/Mt-NCAM2.2 and analyzed the morphology of neurons as above. We found that the aberrant dendritic phenotype induced by the silencing of the ncam2 gene was moderately rescued by coexpression with the Mt-NCAM2.2 isoform in terms of the number of primary dendrites and the longest dendrite length (Fig. 3B-D). Cotransfection with the transmembrane Mt-NCAM2.1 isoform led to a substantial rescue of the dendritic phenotype, as shown by Sholl analysis and the quantification of primary dendrites, longest dendritic length, and dendritic branching (Fig. 3B-D). Both Ncam2 isoforms cooperate in the NCAM2-deficient phenotype, although the rescue produced by the NCAM2.1 isoform was stronger.

Finally, to investigate the possible role of FGFR signaling in the above processes, we performed similar experiments but including a FGFR inhibitor (PD173074) (Skaper et al. 2000). Our results show that blocking FGFR signaling does not alter the dendritic rescue induced by NCAM2 overexpression (Supplementary Fig. 4).

NCAM2 Is Necessary for the Maintenance of the Dendritic Tree

In the above experiments, hippocampal cultures were transfected at 3 DIV, when cultured neurons already have welldeveloped dendrites and axons. In order to determine how the complex dendritic phenotype described above arises, we performed time-lapse imaging experiments in which selected neurons were imaged daily from 4 to 7 DIV. Neurons transfected with a shRNA exhibited relatively stable dendrites around the cell body throughout the experiment (Fig. 4A, upper panels). In contrast, NCAM2-silenced neurons already exhibited dendritic alterations at 48 h after transfection. ShNcam2-transfected neurons showed a progressive thinning of primary dendrites, increased numbers of branching points, and retraction of some of these (up to 80%), which was simultaneous to the formation of a large number of new primary neurites arising from the cell bodies (Fig. 4A, lower panels). These new dendrites were very thin and highly branched. To substantiate these findings, we quantified the number of primary dendrites over time. The data confirm the progressive increase in primary dendrites per cell body after NCAM2 silencing (Fig. 4B).

Finally, we also made high-resolution live-imaging videos (30 min at intervals of 30 s) in 7 DIV transfected neurons in order to investigate the dynamic characteristics of dendrites/neurites (Fig. 4C and Supplementary Video 1). Whereas control dendrites



Figure 2. NCAM2 silencing produces aberrant development of dendritic and axonal arborization of hippocampal neurons in vitro. (A) Immunostaining detection of NCAM2 and the reporter gene GFP in neurons transfected with the NCAM2-specific shRNA (ShNcam2) or the control vector ShCnt. Arrowheads point to neurons transfected with ShCnt and ShNcam2 plasmids. NCAM2-specific signal is reduced upon silencing of NCAM2 in transfected neurons. GFP labeling reveals numerous short neurites arising from ShNncam2-transfected neurons (right panels). (B) ShOll analysis and quantification of different arborization parameters of dendritic trees in neurons transfected with ShNcam2 and ShCnt show a drastic alteration of dendritic trees upon NCAM2 silencing. N = 32 and N = 32 neurons from three independent experiments were analyzed for ShCnt and ShNcam2, respectively. (C) Low magnifications of GFP-labeled ShNcam2- and ShCnt-transfected neurons showing the whole axonal and dendritic trees. Arrows points to axons as determined by morphological parameters; note, in the right panel, an example of a NCAM2-silenced neuron displaying three axons. (D) Quantification of axonal arborization parameters show alterations in longest axon extension and axonal branching in NCAM2-silenced neurons N = 36 and N = 37 neurons from three independent experiments were analyzed for ShCnt are specified neurons from shore independent experiments were analyzed for ShCnt and sonal arborization parameters show alterations in longest axon extension and axonal branching in NCAM2-silenced neuron displaying three axons. (D) Quantification of axonal arborization parameters were analyzed for ShCnt are presented as mean \pm SEX; *P < 0.05, **P < 0.01; ***P < 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; *** + 0.01; ***



Figure 3. Both NCAM2.1 and NCAM2.2 contribute to correct dendritic tree development of hippocampal neurons in vitro. (A) HEK293 cells were cotransfected with different constructs to test the efficiency of ShNcam2 silencing vector and the resistance of mutated NCAM2 forms (Mt-NCAM2.1 and Mt-NCAM2.2) designed for rescue experiments. WB detection of NCAM2 in protein extracts showed that ShNcam2 efficiently targets overexpression of NCAM2.1 and NCAM2.2 isoforms while mutated forms are resistant. WB detection of actim was used as loading control; WB detection of GFP was used to detect expression of the reporter gene. (B) Representative images of GFP immunostaining in neurons transfected with ShCnt, ShNcam2, ShNcam2 + Mt-NCAM2.1, and ShNcam2 + Mt-NCAM2.2 vectors suggesting partial recovery upon overexpression of resistant forms of NCAM2. Sholl analysis (C) and quantification of dendritic tree parameters (D) in neurons corresponding to the rescue experiments. Rescue experiments with NCAM2.1 isoform rescue most of the alterations in dendritic arborization. NCAM2.2 isoform only partially rescues the number of primary dendrites and the longest dendritic length. N = 44, N = 36, N = 42, and N = 37 neurons from three independent experiments were analyzed, respectively, for ShCnt, ShNcam2, ShNcam2 + Mt-NCAM2.1, and ShNcam2 + Mt-NCAM2.2. Data are represented as mean ± SEM; *P < 0.05, ***P < 0.001; one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison post hoc test. Scale bar: 50 µm.

were highly dynamic, especially at their tips displaying highly motile growth cones, NCAM2-silenced neurons did not display typical growth cones at their endings but elongation characteristic of motility, exhibiting continuous cycles of advancement and retraction (Supplementary Video 1). These data, together with the above experiments, suggest that NCAM2 silencing leads to a disruption of dendritic growth cones and a retraction of already formed dendrites, which is concomitant with the formation of a large number of new primary neurites arising from the cell body. These data suggest that NCAM2 is necessary not only for the development of the dendritic tree but also for its maintenance once it has been formed.

NCAM2 Regulates Neuronal Migration and Dendritic Development In Vivo

The above results show that NCAM2 protein is essential for the correct neuronal development of the axonal and dendritic compartments in in vitro experiments. In order to determine the effect of NCAM2 protein depletion in these processes in vivo, we performed in utero electroporation experiments. Mouse embryos were electroporated at E14 with either ShNcam2 or control vectors and analyzed at P0 and P5 using GFP as reporter gene. First, we analyzed the radial distribution of E14-electroporated neurons. At P0, most of the E14-generated



Figure 4. Depletion of NCAM2 in cultured neurons produces dendritic retraction. (A) Time-course imaging of dendritic morphology in vitro from 4 DIV to 7 DIV upon transfection of neurons at 3 DIV with ShCnt (a–d) or ShNeam2 (e–h). Repeated imaging of living neurons was performed upon transfection by detecting the reporter gene GFP. ShNcam2 transfection induced an increased number of dendrites in retraction (black arrowheads) and a reduction of growing dendrites (blue arrowheads) and dendrites bearing growth cones (red arrowheads). Axons in the figure are labeled with an asterisk. (B) Quantification shows a steady increase in the number of primary dendrites in NCAM2-depleted neurons. N = 14 and N = 15. Neurons from three independent experiments were analyzed, respectively, for ShCnt and ShNcam2. (C) Time-lapse imaging was performed at 7 DIV and selected dendritic terminals are shown in higher magnification from the squares marked in (d) and (h), from ShCnt and ShNcam2 neurons, respectively. Images were taken every 30 s for 30 min (complete sequence of images in Supplementary Video 1). Data are represented as mean ± SEM; *** P < 0.001; two-way ANOVA, Bonferroni comparison post hoc test. Scale bars: (A) 10 µm; (C) 5 µm.

control neurons were present in the upper portion of the cortical plate, as expected. E14-generated NCAM2-silenced neurons displayed a wider distribution in the cortical plate at PO, with additional neurons located in the lower layers of the cortical plate (BINs 7-8) (Fig. 5A,B). At P5, E14-born control neurons were correctly positioned in the lower part of layers II-III. NCAM2silenced neurons showed a wider distribution in layers II-III persisting as in PO, which was especially evident in the lower aspect of layers II-III (Fig. 5C,D). We next examined the morphology of E14-GFP-labeled neurons. Already at PO, most electroporated neurons displayed a typical immature pyramidal neuron shape, with a main apical dendrite directed at the marginal zone. In contrast, many NCAM2-silenced neurons did not have a clear apical dendrite and displayed many primary dendrites, often offering a stellate-like morphology (Fig. 5E). Indeed, this aberrant phenotype was more evident at P5 when control neurons displayed a typical pyramidal shape (including a prominent apical dendrite, triangular cell body shapes, and a few basal dendrites), whereas NCAM2-silenced neurons

lacked a clear main apical dendrite and displayed numerous primary dendrites arising from any position in the cell body (thereby again displaying a stellate-like morphology) (Fig. 5F,G). Quantification of the number of primary dendrites and of their orientation confirmed these aberrant phenotypes at P5 (Fig. 5G). These results indicated that the NCAM2 protein is necessary for correct cortical migration and for the appropriate development of dendritic trees in vivo in cortical pyramidal neurons.

NCAM2 Is Not Required for Adult Dendritic Maintenance

NCAM2 protein is also highly expressed in the adult brain (Supplementary Fig. 1A). To determine whether the NCAM2 is also required for the maintenance of adult dendritic cortical architecture, we performed lentiviral injections of ShNcam2 constructs coexpressing GFP in CA1 hippocampal neurons and in granule cells of adult mice; animals were analyzed 4 weeks after injections. Lentiviral ShNcam2 effectiveness on endogenous *ncam2*



Figure 5. NGAM2 regulates neuronal migration and dendritic tree formation in vivo. (A) Representative images of GFP-electroporated neurons in cortical sections for P0 mice, which were electroporated with the ShNcam2 and ShCnt vectors at E14. Distribution of cells within cortical layers was determined in sections counterstained with DAPI. (B) Quantification of neuronal distribution at P0 of transfected cells within cortical layers was determined by dividing cortical thickness in 10 Bins. ShNcam2 and N=7, animals electroporated with ShCnt and ShNcam2 constructs; ***P < 0.001; two-way ANOVA, Bonferroni comparison post hoc test. (C) Representative images from the reporter gene GFP immunodetection in cortical sections for P5 mice, which were electroporated with the ShNcam2 and ShCnt vectors at E15. (D) Quantification of neuronal distribution at P5 confirmed differences between control and NcAM2-silenced neurons, with the latter occupying lower positions in cortical layer also in P5. Data are presented as the ratio of neurons with somas located in each Bin; N = 3 and N = 2, animals electroporated neurons with Schma 2 constructs; **P < 0.001; two-way ANOVA, Bonferroni comparison post hoc test. (C) Representative images from the ratio of neurons with somas located in each Bin; N = 3 and N = 2, animals electroporated with ShCnt and ShNcam2 constructs; *P < 0.05; two-way ANOVA, Bonferroni comparison post hoc test. (C) Higher magnification of representative images from the lectroporated neurons at P0 during neuronal migration. Neurons with NCAM2 silencing show stellate phenotype into dendrites arising from all sides of cell body (arrowheads). (G) Neurons electroporated with ShNcam2 construct show increased numbers of primary dendrites with an increased amount of lateral primary dendrites. N = 122 and N = 87 neurons were analyzed to determine number of primary dendrites with an increased amount of lateral primary dendrites. N = 122 and N = 87 neurons were analyzed to determine distribution of primary dendrites in ShCnt an

was corroborated in primary neuronal cultures showing a high reduction in both NCAM2.1 and NCAM2.2 protein levels, while control ShCnt lentivirus did not affect them (Supplementary Fig. 2E). Both in control and NCAM2-silenced neurons, pyramidal cells displayed a typical morphology including a prominent apical dendrite with horizontal dendrites and a prominent apical dendritic tuft, as well as many basal dendrites directed toward the ventricular surface. Branching alterations and abnormally retracted dendritic morphology were not observed in NCAM2-silenced pyramidal neurons (Supplementary Fig. 5). These results indicate that, unlike in developing neurons, the NCAM2 protein is not necessary for the maintenance of dendritic tree morphology in adult neurons already integrated in circuitry.

NCAM2 Silencing Generates Alterations in Microtubule Polymerization and Cytoskeleton Proteins

Because dendritic and axonal stability largely depend on cytoskeletal components, we next explored whether knockdown of NCAM2 alters cytoskeletal composition/distribution in neurons. As a first step, we analyzed the distribution of several cytoskeletal proteins in NCAM2-silenced neurons by immunofluorescence, focusing on the dendritic compartment. Whereas the distribution and immunofluorescence signal for actin, Tau, or neurofilaments were not affected by NCAM2 depletion (Supplementary Fig. 6). These studies also showed that the short dendrites arising from NCAM2-silenced neurons were neurofilament- and Tau-negative (Supplementary Fig. 6). We found a decrease in the immunofluorescence intensity signal for tubulin, acetylated tubulin (AcTub), and detyrosinated tubulin (DetyrTub) in the somatodendritic region of ShNcam2transfected neurons (Supplementary Fig. 7A,B). Moreover, acetylated tubulin immunofluorescence signal was reduced in the axon (Supplementary Fig. 7C).

Next, we investigated the distribution of MAP2 protein, a dendritic microtubule-associated protein. MAP2 immunofluorescence signals were dramatically reduced in NCAM2-silenced neurons and virtually absent in distal dendritic segments (Fig. 6A,B). A similar decrease was found in live imaging tracked neurons in retracting dendrites in NCAM2 knocked down at 3 DIV, once early dendrites had been formed (Fig. 6C). These findings show that the depletion of NCAM2 leads to a marked decrease in MAP2 protein in both emerging and already formed dendrites (Fig. 6).

Because tubulin acetylation and detyrosination are posttranslational modifications typically found on more stable microtubules, the above results suggest that NCAM2 may control stability of the microtubule network, resulting in a decreased stability upon NCAM2 knockdown. To determine whether microtubule destabilization mediates NCAM2 silencing-induced dendritic alterations, we performed experiments using taxol to stabilize microtubules and reduce catastrophe rates (Witte et al. 2008). We found that with taxol treatment the NCAM2-silenced hippocampal neurons exhibited robust MAP2 staining similar to that in control neurons (Fig. 7A), indicating that microtubule stabilization can rescue the silencing phenotype. Quantification of the number of primary dendrites confirmed that treatment with taxol partially recovered the aberrant dendritic phenotype in NCAM2-silenced neurons (Fig. 7B). These findings indicate that the dendritic alterations in NCAM2-silenced cells are at least in part mediated by destabilization of the microtubule network.

Next, we performed microtubule polymerization assays, using the recombinant EB3-tomato protein as a marker for growing microtubule plus ends in time-lapse imaging (Sanchez-Huertas et al. 2016). ShCnt and ShNcam2 were transfected at 4 DIV, and 2 days later, EB3-comet number, trajectories, and velocity in dendritic tracts were tracked and represented in kymographs (Fig. 7C). We found that NCAM2 silencing did not significantly alter the average speed and mixed orientation of the comets, although it induced a significantly reduced density of comets and slightly modulated the speed of retrograde comets. (Fig. 7D). We also explored the dynamics of growing microtubule plus ends in axons, in which microtubules have an almost exclusively anterograde orientation (Fig. 7E). We found reduced comet density and increased average length (Fig. 7F). Together, our data show that NCAM2 regulates the stability of the microtubule network and suggest that NCAM2 depletion has a destabilizing effect, resulting in a reduced number of dendritic microtubules.

NCAM2 Interacts with 14-3-3, CaMKII, and MAP2, and These Interactions Are Essential for Proper Dendrite Development

Having proved that dendritic alterations caused by NCAM2 knockdown involve changes in the stability of the microtubule network, we sought to identify the putative molecular mediators of this process. We addressed this aim with a proteomic approach by immunoprecipitating NCAM2-associated proteins and performing a subsequent mass spectrometry analysis. Briefly, P10-12 cortical extracts were enriched in cell membranes and immunoprecipitated with anti-NCAM2 antibodies. Bound proteins were identified using mass spectrometry, with a total of 103 proteins found, out of which 54 were identified by two or more different peptide sequences. Among these, potential NCAM2 interactors included six proteins annotated in four different gene ontology (GO) terms linked to cytoskeleton (i.e., MAP2, YWHAE [14-3-3 ξ], CALM1, DINLL1, TUBB4A, and CAMKII β proteins, which are annotated in the following GO terms: cell projection [GO:0042995], cytoskeleton [GO:0005856], cytoskeletal part [GO:0044430], and microtubule cytoskeleton [GO:0015630]). Microtubule-associated protein 2 (MAP2) was the main NCAM2 interactor, since it was detected by 24 different single peptides corresponding to both MAP2B and MAP2C isoforms (20 specific peptides for MAP2B and 4 peptides with shared sequences between both isoforms) (Supplementary Fig. 8). We identified peptides corresponding to 14-3-3 ζ (6 specific peptide sequences), 14-3-3 γ (4 specific peptide sequences), and 14-3-3 ξ (1 peptide sequences), as well as two additional peptides with shared sequences between the three isoforms (Supplementary Fig. 8). Additionally, we also identified CaMKII α and CaMKII β isoforms, with six and five specific peptides for each isoform respectively, as well as six shared peptides between the two isoforms (Supplementary Fig. 8). To validate these putative interactions, we performed reverse coimmunoprecipitation assays for MAP2 and 14-3-3 proteins. WBs revealed that immunoprecipitation of protein extracts from P3 forebrains with NCAM2 antibodies yielded MAP2B, MAP2C, and 14-3-3 bands identified with specific antibodies (Fig. 8A,B). Reverse immunoprecipitation with MAP2 and 14-3-3 antibodies led to the identification of weak bands compatible with the MW of the NCAM2.1 isoform (Supplementary Fig. 8). These data indicate that NCAM2 molecules interact with the pool of cytoskeletal proteins (e.g., MAP2 and 14-3-3).

We next investigated whether these cytoskeletal proteins were necessary for the dendritic phenotype seen in NCAM2deficient neurons. We cotransfected hippocampal neurons with the ShNcam2-silencing vector together with CaMKII α , CaMKII β 14-3-3 ξ , 14-3-3 γ , 14-3-3 ζ , MAP2B, or MAP2C overexpressing cDNA. While silencing of the NCAM2 gene resulted in the aberrant dendritic phenotype described above, with many short neurites arising from the cell bodies, cotransfection with



Figure 6. NCAM2 depletion alters the MAP2 protein levels in neurons with a dendrite retraction process. (A) ShCnt- or ShNcam2-transfected neurons were immunostained for MAP2 (red) and GFP (green). Quantification of MAP2 staining in GFP-labeled neurons transfected with ShCnt or ShNcam2 (N = 27 ShCnt and N = 27 ShNcam2 neurons). Quantifications indicate a reduction of MAP2 content upon depletion of NCAM2. (B) Higher magnification of a representative dendritic shaft in the immunostaining of MAP2 marker. A cross-section of each dendrite was selected for quantification (white lines). Plot profile of the section in dendritic shafts depicted. (C) ShCnt- or ShNcam2-transfected neurons from the live-imaging experiment, Figure 5, were immunostained for GFP (green), MAP2 (red), and ACTIN (blue). The images confirm a reduction in MAP2 levels in ShNcam2-transfected neurons. Scale bar: 5 µm.

either 14-3-3 γ , 14-3-3 ζ , or MAP2C encoding cDNAs resulted in a marked rescue of this aberrant phenotype, with neurons displaying long dendrites and few primary dendrites, similar to control neurons (Fig. 8C). Quantitative analyses of the number of primary dendrites confirmed these observations (Fig. 8D). A partial rescue was found when 14-3-3¢, MAP2B,



Figure 7. NCAM2 depletion alters tubulin polymerization in dendrites and axons. (A) Immunostaining of MAP2 and GFP in neurons transfected with ShCnt or ShNcam2 from 3 DV to 7 DIV and treated with Taxol or DMSO from 4 DIV to 7 DIV. The aberrant morphology induced by ShNCam2 is partially recovered after Taxol treatment. (B) Quantification of the number of primary dendrites in neurons from three independent experiments with Taxol assay. N = 50, N = 52, N = 48, and N = 49 neurons were analyzed, respectively, for ShCnt+DMSO, ShCnt+Taxol, ShNcam2 + DMSO, and ShNcam2 + Taxol. (C) Representative kymographs of EB3-fluoresecence from the time-lapse imaging in 25-µm dendritic tracts from neurons cotransfected with recombinant EB3-tomato protein and ShCnt or ShNcam2 from 4 DIV to 6 DIV. (D) Quantification of different parameters in tracked EB3-comets from the kymographs depicted in (C) indicates a reduction in density and an increase in length of the comets upon depletion of NCAM2. N = 25 ShCnt and N = 27 ShNcam2 neurons from two independent experiments. (E) Representative kymographs of EB3-fluoresecence in 25 µm axonal tracts from neurons cotransfected with recombinant EB3-tomato protein and ShCnt or 5DNcam2 from 4 DIV to 6 DIV. (P) Quantification of different parameters in tracked EB3-comets from the kymographs depicted in (C) indicates a reduction in density and an increase in length of the comets upon depletion of NCAM2. N = 25 ShCnt and N = 27 ShNcam2 neurons from two independent experiments. (E) Representative kymographs of EB3-fluoresecence in 25 µm axonal tracts from neurons cotransfected with recombinant EB3-tomato protein and ShCnt or ShNcam2 from 4 DIV to 6 DIV. (F) Quantification of different parameters in tracked EB3-comets from kymographs depicted in (E) indicates a reduction in density and an increase in length of the comet upon depletion of NCAM2. N = 30 ShCnt and N = 27 ShNcam2 neurons from three independent experiments. *P < 0.05; ****P < 0.001; one-way ANOVA, Tukey's multiple com

and CaMKII β proteins were overexpressed in NCAM2-silenced neurons while cotransfection with CaMKII α did not lead to any significant rescue (Fig. 8C,D). We conclude that the overexpression of the NCAM2-associated cytoskeletal CaMKII, MAP2, and 14-3-3 protein isoforms is sufficient to rescue the dendritic phenotype of NCAM2-deficient neurons. Together with our previous findings on microtubules, these observations suggest that NCAM2 in complexes with cytoskeletal-associated proteins promotes the stability of the microtubule network in dendrites and that loss of this regulation is responsible



Figure 8. MAP2, CaMKII, and 14-3-3 isoforms interact with NCAM2 and rescue the NCAM2-silenced phenotype. (A, B) Western blot detection of NCAM2.1 with either MAP2 isoforms (A) or 14-3-3 isoforms (B) in different communoprecipitation experiments from P12–15 mouse cortex and hippocampal protein extracts. Immunoprecipitation using NCAM2 antibodies confirmed the presence of MAP2 and 14-3-3 proteins in the WBs. (C) Representative images of the somatodendritic compartment in neurons cortransfected with shRNAs (ShCnt or ShNcam2) and MAP2 isoforms (β , C), 14-3-3 isoforms (ξ , ζ and γ), and CaMKII isoforms (α and β) evidencing rescue phenotype in most of the cases. (D) Quantifications of number of primary dendrite neurons cortransfected with 14-3-3 ζ , 14-3-3 ζ , CaMKII α , CaMKII β , MAP2B, and MAP2C; with either ShCnt or ShNCam2 the strongest rescue was found with 14-3-3 ζ and γ and with MAP2C. N = 28-34 neurons were analyzed, respectively, in each group from 2 to 3 independent experiments per condition. (E) Schematic representation of interactions and phenotype in NCAM2 normal or NCAM2 knockdown neurons. ** $P \sim 0.05$, ** P < 0.05, ** P < 0.05,

for the dendritic alterations reported upon NCAM2 depletion (Fig. 8E).

Discussion

The present study reveals that the NCAM2 gene is essential not only for dendritic development and morphogenesis but also for dendritic maintenance. In addition, our data provide evidence for a role of NCAM2 in neuronal migration, and they point to microtubule-associated proteins as important components in NCAM2 functions.

Whereas the expression and role of the NCAM2 protein have been extensively studied in the olfactory system (Alenius and Bohm 1997; Paoloni-Giacobino et al. 1997), to date NCAM2 expression has remained largely unknown in other CNS areas including the cerebral cortex. Our data show wide expression of the NCAM2 gene in cortical areas, from E14 onward, present in both the dendritic and fiber compartments. Moreover, the NCAM2.1 isoform is more abundant than the truncated NCAM2.2 isoform, with the latter detectable by WB only after P10.

Recent studies have shown an interesting role of NCAM2 in the formation and maintenance of excitatory glutamatergic synapses (Leshchyns'ka et al. 2015; Sheng et al. 2018). Here, we show that whereas the overexpression of NCAM2 leads to moderate alteration of axonal tree, the downregulation of NCAM2 gene results in dramatic changes in both the dendritic and the axonal architectures of hippocampal neurons in vitro. Thus, NCAM2-deficient neurons show decreased, and shorter, dendritic and axonal trees, as well as a dramatic increase in short primary dendrites arising from the cell bodies. To unravel the cellular process involved in this phenotype, we made time-lapse video recordings after NCAM2 depletion. These experiments revealed that upon NCAM2 depletion, already well-developed dendritic shafts became thinner and retracted, concomitantly to the emergence of narrower, short neurites arising from the cell body. Thus, although some of these primary, aberrant neurites are formed "de novo" (Fig. 4), the fact that most are retracting dendrites, are faintly stained for MAP2, are Tau-negative, and are considerably longer than typical filopodial neural extensions (up to 10 µm) (Qu et al. 2017) leads us to consider them as dendrites. However, some of the features of these processes resemble the so-called proto-dendrites (Kahn et al. 2015).

Interestingly, this in vitro phenotype was mimicked in in vivo experiments, in which NCAM2-deficient cortical pyramidal neurons exhibit a radial phenotype, thinner dendrites, and the lack of a prominent apical dendrite. We thus conclude that NCAM2 is necessary for proper dendritic development and maintenance and for the correct cytoarchitecture of pyramidal neurons. Interestingly, we were unable to detect changes in dendritic architecture when the NCAM2 gene was silenced in adult hippocampal neurons, suggesting that the role of NCAM2 in dendritic formation is developmental stage-dependent. Our rescue experiments with both the NCAM2.1 and NCAM2.2 isoforms indicate that although both are able to partially rescue the NCAM2-knockdown phenotype, such rescue was more efficient in NCAM2.1-overexpressing neurons (e.g., Sholl analysis, Fig. 3C and dendritic tree parameters, Fig. 3D). This is consistent with the fact that the longest NCAM2.1 form is highly expressed during development, whereas the shorter NCAM2.2 isoform appears to be expressed only after P10. Our data thus suggest that the endogenous NCAM2.1 isoform is the main protein responsible for the described phenotype. We can only speculate about how the NCAM2.2 isoform, lacking the intracellular domain, may partially rescue the dendritic aberrant phenotype. One possibility is that the effects of the NCAM2.2 isoform are mediated by transmembrane interacting proteins, such as the FGF receptor (Rasmussen et al. 2018), which may activate the specific intracellular signaling cascades. However, although a contribution of FGFR to NCAM2 functions could not be completely ruled out, our experiments using FGFR inhibitors suggest that, at least for dendritic differentiation and morphogenesis, NCAM2 effects are largely independent of FGFR signaling. Also, and in contrast to NCAM1 (Soroka et al. 2003, 2010), synergy in cis of coexpressed NCAM2.1 and NCAM2.2 isoforms in the same neurons seems unlikely, due to the rigid structure of the immunoglobulin domains of NCAM2, which may favor trans interactions (Kulahin et al. 2011; Rasmussen et al. 2018). It has been described that the domains responsible for NCAM2-NCAM2 interactions (immunoglobulin domains) present a rigid structure that may prevent a potential cis and favor trans interactions (Kulahin et al. 2011). Thus, the analysis of synergistic effects in cis configuration (coexpression within the same cell) is unlikely to be informative. In contrast, NCAM1 presents a quite more flexible structure that permits cis interactions (Soroka et al. 2003, 2010). Nevertheless, our data suggest that NCAM2.1 and NCAM2.2 isoforms have, at least in part, overlapping functions.

We also describe an unknown role of NCAM2 in cortical migration; embryonic, cell-autonomous NCAM2 depletion of cortical precursors results in the mispositioning of cortical pyramidal neurons, which is likely to be permanent, as neuron misposition remains at P5, once cortical migration has been completed (Marin 2013). A direct role of NCAM2 in neuronal migration is consistent with the expression of the NCAM2 gene in embryonic cortical precursors. However, we cannot exclude the possibility that the observed migration phenotype is secondary to the alterations in dendritic orientation, which may potentially interfere with the function of the leading edge of migrating neurons (Demyanenko et al. 2004).

Our experiments also suggest a putative role of the NCAM2 gene in neuronal polarization. The determination and differentiation of early neurites in dendrites and axons is a complex process in which many proteins and pathways have been implicated including TAG-1 or small GTPases (Jossin and Cooper 2011; Caceres et al. 2012; Namba et al. 2014; Shah and Puschel 2014; Takano et al. 2015). Our experiments first reveal that a small, but substantial, number of NCAM2-depleted neurons (20%) exhibits two or more axons. Second, NCAM2 depletion results in the retraction of already formed primary dendrites and the appearance of newly formed thin neurites with clearly lacking dendritic markers (MAP2, Fig. 6) or axonal markers (Tau or neurofilaments, Supplementary Fig. 6). Whereas they display normal actin abundance, these neurites were extremely motile and displayed numerous growing and retracting filopodia-like structures. Although the molecular mechanisms involved in this process remain to be determined, it is likely that the NCAM2dependent stabilization of the microtubule network (see below) is one of the mechanisms involved.

One of the most relevant findings of the present study involves the changes in cytoskeletal proteins caused by NCAM2 deficiency. First, we found that NCAM2 depletion led to a decrease in microtubule markers, including tubulin, as well as acetylated and detyrosinated tubulin, suggesting a role of NCAM2 in the stabilization of microtubules. Consistent with this, our microtubule comet tracking studies reveal that NCAM2-deficient dendrites display decreased comet density. In axons, NCAM2 depletion led to a more severe comet phenotype. These findings are consistent with the notion that NCAM2 depletion results in destabilization of the microtubule network. In contrast, the actin network appeared to remain unaltered. Most importantly, microtubule stabilization by taxol treatment markedly rescued NCAM2-depletion effects, strongly suggesting that a compromised microtubule network is underlying the aberrant dendritic phenotype in NCAM2-deficient neurons. The intensity of MAP2 staining upon taxol treatment was markedly increased, suggesting that microtubule stabilization by taxol may in turn stabilize MAP2 protein in dendrites (Witte et al. 2008).

Consistent with these data, we show that the depletion of NCAM2 results in a dramatic reduction in the amount of the dendritic protein MAP2, a microtubule-associated protein fundamental for dendritic cytoarchitecture and maintenance (Huber and Matus 1984; Caceres et al. 1992; Harada et al. 2002) and that MAP2B/C overexpression rescues the NCAM2 phenotype. Further, our mass spectrometry and coimmunoprecipitation studies reveal that NCAM2 protein interacts with MAP2B and MA2C isoforms and that overexpression of either MAP2B or MAP2C isoforms almost completely rescues the dendritic phenotype caused by NCAM2 depletion. As it is likely that only a small pool of MAP2 protein is actually directly interacting with NCAM2 protein at the cell membrane, we can only speculate about the possible mechanisms implicated in the depletion of MAP2 protein throughout the dendrite and the parallel disorganization of the dendritic network. In many CAMs, "cortical" membrane-linked cytoskeletal proteins have a profound effect on the organization of the remaining cytoskeleton (Maness and Schachner 2007). It is thus conceivable that the direct interaction of NCAM2 with the outermost located MAP2 protein is sufficient to control both the outermost and central microtubular networks (Kapitein and Hoogenraad 2015; Leshchyns'ka and Sytnyk 2016). Also, microtubule arrays in dendrites were shown to spatially segregate into bundles based on their post-translational modifications and their orientation. While it is not known what microtubule properties are recognized by MAP2, it may selectively associate with a subset of dendritic microtubules (Tas et al. 2017). In addition, the effect of NCAM2 could be mediated by specific signaling pathways (e.g., 14-3-3, CaMKII or Src) which, when activated close to the membrane, may regulate the phosphorylation levels of MAP2 throughout the dendrite. Indeed, it is known that CaMKII, Src, or 14-3-3 controls the microtubule dynamics via MAP2 phosphorylation levels (Sanchez et al. 2000; McVicker et al. 2015; Jansen et al. 2017; Sheng et al. 2019). Interestingly, the above two possible mechanisms may in turn regulate MAP2 protein instability. Finally, it is possible that NCAM2 may regulate gene expression (in this case MAP2) similarly to what has been observed for other cell-adhesion molecules. For instance, L1CAM, which directly interacts with MAP2, has also been described to control the expression levels of MAP2 (Poplawski et al. 2012).

Although MAP2B and MAP2C have a different expression pattern during neuronal morphogenesis, both isoforms present the microtubule-binding domain. This domain is important for the microtubule bundling, protrusion, and formation and also binds different signaling proteins that modulate microtubule organization and stability (Chen et al. 1992; Belanger et al. 2002; Melkova et al. 2019). Since the lack of the projection domain in MAP2C does not impede this isoform to rescue the phenotype of NCAM2-depletion, we hypothesize that the mechanism of rescuing the proper number of primary dendrites may be directly attributable to the microtubule-binding domain and stabilization of microtubules. However, additional, distinct properties of MAP2B and MAP2C may contribute to the rescue of the NCAM2 phenotype. For instance, MAP2B has been shown to lower microtubule dynamics, leading to increased diameter of dendrites and consolidated dendritic branches (Belanger et al. 2002; Dehmelt and Halpain 2005). Together, these data suggest that the NCAM2 protein contributed to the stabilization of dendritic microtubules; upon NCAM2 downregulation, MAP2 protein content decreases concomitantly with the destabilization and decrease of the dendritic microtubule network.

In addition, our mass spectrometry data and coimmunoprecipitation experiments reveal interaction of NCAM2 with other cytoskeletal proteins, such as 14-3-3 ξ , γ , and ζ isoforms and the CaMKII α and β isoforms. 14-3-3 proteins form either heterodimers or homodimers and have been described as interacting with both the microtubule and actin cytoskeletons participating in several neuronal developmental processes (Berg et al. 2003; Sarmiere and Bamburg 2004; Sluchanko and Gusev 2010; Brandwein and Wang 2017). Among other developmental and plasticity processes, CaMKII protein isoforms are also known to regulate neuritogenesis (Sogawa et al. 2001; Fink et al. 2003). Similar to overexpression of MAP2 isoforms, the 14-3-3 γ and ζ isoforms also efficiently rescued dendritic abnormalities induced by NCAM2 deficiency, and a partial rescue was observed for the 14-3-3 ξ and CaMKII β proteins. These data suggest that NCAM2/MAP2/14-3-3 protein complexes may contribute to the stability of the microtubule network in dendrites, whose disruption leads to severe dendritic malformation. Although the molecular details of this mechanism remain to be investigated, such regulation may be similar to what has been proposed for L1CAM, whose depletion results in regulated MAP2 degradation (Poplawski et al. 2012).

In summary, the present study provides evidence for previously unknown roles of the NCAM2 proteins in distinct important corticogenesis processes, namely dendritic development and maintenance, neuronal migration, and neuronal polarization (Fig. 8E). Furthermore, we have uncovered a molecular network (MAP2 and 14-3-3 proteins) by which NCAM2 regulates the stability of dendritic microtubules. Given the proposed role of the NCAM2 gene in several neurodevelopmental disorders including autism, Down syndrome, macro- and microcephaly (Molloy et al. 2005; Petit et al. 2015; Lin et al. 2016; Scholz et al. 2016), as well as the contribution of MAP2 and 14-3-3 genes to autism and developmental epilepsy (Mukaetova-Ladinska et al. 2004; Xu et al. 2015; Pagan et al. 2017; Westphal et al. 2018), future analysis of the interplay between NCAM2-organized protein complexes with the dendritic microtubule cytoskeleton may improve our understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in these pathologies.

Supplementary Material

Supplementary material can be found at Cerebral Cortex online.

Funding

MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad) grants SAF2016-76340-R to E.S. and L.P., and BFU2015-69275-P and PGC2018-099562-B-I00 to J.L.; Department of Economy and Knowledge of the Generalitat de Catalunya (Predoctoral fellowship to A.P.); Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-ISCIII) collaborative intramural projects to E.S.; The Marató de TV3 Foundation to L.P.; NIH grants R01 NS109176 to S.S.; and R21 NS101450 to S.S. and A.L.T.; and IRB Barcelona (Institut de Recerca Biomédica) intramural funds.

Notes

We thank N. Masachs for technical assistance in viral injections; E. de Oliveira and M.A. Odena for mass spectrometry experiments; L. Bardia and A. LLadó (Microscopy facility of the IRB-Barcelona); A. Bosch, E. Coll and M. Calvo (Microscopy facility of the University of Barcelona), and members of the Soriano lab for experimental help and comments. *Conflict of Interest*: The authors declare no competing financial interests.

Authors' Contributions

E.S., L.P., and A.P. conceived and designed the study. A.P. performed most of the experiments and analyzed the data. A.O. and B.P.-A. contributed to NCAM2 depletion and rescue experiments in in vitro cultures. R.V. contributed to comet experiments. K.H., A.T., and S.S. contributed to the design and performed in utero electroporation and in situ hybridization. J.F.-S. and R.T. contributed to design and produced the shRNAs. J.L. designed and supervised the cytoskeletal network characterization and microtubule dynamics. A.P., L.P., and E.S. wrote the manuscript. All authors read, discussed, and corrected the manuscript.

References

- Alenius M, Bohm S. 1997. Identification of a novel neural cell adhesion molecule-related gene with a potential role in selective axonal projection. J Biol Chem. 272:26083–26086.
- Angata K, Huckaby V, Ranscht B, Terskikh A, Marth JD, Fukuda M. 2007. Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors are essential for mouse brain development. Mol Cell Biol. 27:6659–6668.
- Belanger D, Farah CA, Nguyen MD, Lauzon M, Cornibert S, Leclerc N. 2002. The projection domain of MAP2b regulates microtubule protrusion and process formation in Sf9 cells. J Cell Sci. 115:1523–1539.
- Bentley M, Banker G. 2016. The cellular mechanisms that maintain neuronal polarity. Nat Rev Neurosci. 17:611–622.
- Berg D, Holzmann C, Riess O. 2003. 14-3-3 proteins in the nervous system. Nat Rev Neurosci. 4:752–762.
- Brandwein D, Wang Z. 2017. Interaction between Rho GTPases and 14-3-3 proteins. Int J Mol Sci. 18(10), 2148; https://doi.org/10.3390/ijms18102148.
- Caceres A, Mautino J, Kosik KS. 1992. Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron*. 9:607–618.
- Caceres A, Ye B, Dotti CG. 2012. Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment. Curr Opin Cell Biol. 24:547–553.
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. Nature. 360:674–677.
- Dehmelt L, Halpain S. 2005. The MAP2/tau family of microtubuleassociated proteins. Genome Biol. 6:204.
- Demyanenko GP, Schachner M, Anton E, Schmid R, Feng G, Sanes J, Maness PF. 2004. Close homolog of L1 modulates area-

specific neuronal positioning and dendrite orientation in the cerebral cortex. *Neuron*. 44:423–437.

- Dent EW, Gupton SL, Gertler FB. 2011. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3(3), a001800; doi:10.1101/cshperspect. a001800.
- Farah CA, Liazoghli D, Perreault S, Desjardins M, Guimont A, Anton A, Lauzon M, Kreibich G, Paiement J, Leclerc N. 2005. Interaction of microtubule-associated protein-2 and p63: a new link between microtubules and rough endoplasmic reticulum membranes in neurons. J Biol Chem. 280: 9439–9449.
- Fink CC, Bayer KU, Myers JW, Ferrell JE Jr, Schulman H, Meyer T. 2003. Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron*. 39:283–297.
- Gumy LF, Katrukha EA, Grigoriev I, Jaarsma D, Kapitein LC, Akhmanova A, Hoogenraad CC. 2017. MAP2 defines a pre-axonal filtering zone to regulate KIF1- versus KIF5dependent cargo transport in sensory neurons. Neuron. 94: 347–362.
- Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N. 2002. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. J Cell Biol. 158: 541–549.
- Huber G, Matus A. 1984. Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2, in rat brain. J Neurosci. 4:151–160.
- Hussman JP, Chung RH, Griswold AJ, Jaworski JM, Salyakina D, Ma D, Konidari I, Whitehead PL, Vance JM, Martin ER et al. 2011. A noise-reduction GWAS analysis implicates altered regulation of neurite outgrowth and guidance in autism. Mol Autism. 2:1.
- Jansen S, Melkova K, Trosanova Z, Hanakova K, Zachrdla M, Novacek J, Zupa E, Zdrahal Z, Hritz J, Zidek L. 2017. Quantitative mapping of microtubule-associated protein 2c (MAP2c) phosphorylation and regulatory protein 14-3-3zeta-binding sites reveals key differences between MAP2c and its homolog tau. J Biol Chem. 292:6715–6727.
- Jorgensen OS, Bock E. 1974. Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. J Neurochem. 23:879–880.
- Jossin Y, Cooper JA. 2011. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. Nat Neurosci. 14:697–703.
- Kahn OI, Sharma V, Gonzalez-Billault C, Baas PW. 2015. Effects of kinesin-5 inhibition on dendritic architecture and microtubule organization. Mol Biol Cell. 26:66–77.
- Kapitein LC, Hoogenraad CC. 2015. Building the neuronal microtubule cytoskeleton. Neuron. 87:492–506.
- Kiselyov VV, Skladchikova G, Hinsby AM, Jensen PH, Kulahin N, Soroka V, Pedersen N, Tsetlin V, Poulsen FM, Berezin V et al. 2003. Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. Structure. 11:691–701.
- Kon E, Cossard A, Jossin Y. 2017. Neuronal polarity in the embryonic mammalian cerebral cortex. Front Cell Neurosci. 11:163.
- Kulahin N, Kristensen O, Rasmussen KK, Olsen L, Rydberg P, Vestergaard B, Kastrup JS, Berezin V, Bock E, Walmod PS et al. 2011. Structural model and trans-interaction of the entire ectodomain of the olfactory cell adhesion molecule. Structure. 19:203–211.

- Kulahin N, Walmod PS. 2010. The neural cell adhesion molecule NCAM2/OCAM/RNCAM, a close relative to NCAM. Adv Exp Med Biol. 663:403–420.
- Leshchyns'ka I, Liew HT, Shepherd C, Halliday GM, Stevens CH, Ke YD, Ittner LM, Sytnyk V. 2015. Aβ-dependent reduction of NCAM2-mediated synaptic adhesion contributes to synapse loss in Alzheimer's disease. Nat Commun. 6:8836.
- Leshchyns'ka I, Sytnyk V. 2016. Reciprocal interactions between cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily and the cytoskeleton in neurons. Front Cell Dev Biol. 4:9.
- Lin YC, Frei JA, Kilander MB, Shen W, Blatt GJ. 2016. A subset of autism-associated genes regulate the structural stability of neurons. Front Cell Neurosci. 10:263.
- Makino T, McLysaght A. 2010. Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:9270–9274.
- Maness PF, Schachner M. 2007. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. Nat Neurosci. 10:19–26.
- Marin O. 2013. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. Eur J Neurosci. 38:2019–2029.
- McVicker DP, Millette MM, Dent EW. 2015. Signaling to the microtubule cytoskeleton: an unconventional role for CaMKII. *Dev Neurobiol.* 75:423–434.
- Melkova K, Zapletal V, Narasimhan S, Jansen S, Hritz J, Skrabana R, Zweckstetter M, Ringkjobing Jensen M, Blackledge M, Zidek L. 2019. Structure and functions of microtubule associated proteins tau and MAP2c: similarities and differences. Biomolecules. 2019, 9, 105; doi:10.3390/biom9030105.
- Missaire M, Hindges R. 2015. The role of cell adhesion molecules in visual circuit formation: from neurite outgrowth to maps and synaptic specificity. *Dev Neurobiol*. 75:569–583.
- Molloy CA, Keddache M, Martin LJ. 2005. Evidence for linkage on 21q and 7q in a subset of autism characterized by developmental regression. Mol Psychiatry. 10:741–746.
- Mukaetova-Ladinska EB, Arnold H, Jaros E, Perry R, Perry E. 2004. Depletion of MAP2 expression and laminar cytoarchitectonic changes in dorsolateral prefrontal cortex in adult autistic individuals. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 30:615–623.
- Muller D, Mendez P, Deroo M, Klauser P, Steen S, Poglia L. 2010. Role of NCAM in spine dynamics and synaptogenesis. Adv Exp Med Biol. 663:245–256.
- 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.
- Namba T, Kibe Y, Funahashi Y, Nakamuta S, Takano T, Ueno T, Shimada A, Kozawa S, Okamoto M, Shimoda Y et al. 2014. Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. Neuron. 81:814–829.
- Pagan C, Goubran-Botros H, Delorme R, Benabou M, Lemiere N, Murray K, Amsellem F, Callebert J, Chaste P, Jamain S et al. 2017. Disruption of melatonin synthesis is associated with impaired 14-3-3 and miR-451 levels in patients with autism spectrum disorders. Sci Rep. 7:2096.
- Paoloni-Giacobino A, Chen H, Antonarakis SE. 1997. Cloning of a novel human neural cell adhesion molecule gene (NCAM2) that maps to chromosome region 21q21 and is potentially involved in Down syndrome. *Genomics*. 43:43–51.
- Pebusque MJ, Coulier F, Birnbaum D, Pontarotti P. 1998. Ancient large-scale genome duplications: phylogenetic and linkage analyses shed light on chordate genome evolution. Mol Biol Evol. 15:1145–1159.

- Petit F, Plessis G, Decamp M, Cuisset JM, Blyth M, Pendlebury M, Andrieux J. 2015. 21q21 deletion involving NCAM2: report of 3 cases with neurodevelopmental disorders. Eur J Med Genet. 58:44–46.
- Poplawski GH, Tranziska AK, Leshchyns'ka I, Meier ID, Streichert T, Sytnyk V, Schachner M. 2012. L1CAM increases MAP2 expression via the MAPK pathway to promote neurite outgrowth. Mol Cell Neurosci. 50:169–178.
- Qu Y, Hahn I, Webb SE, Pearce SP, Prokop A. 2017. Periodic actin structures in neuronal axons are required to maintain microtubules. Mol Biol Cell. 28:296–308.
- Rasmussen KK, Falkesgaard MH, Winther M, Roed NK, Quistgaard CL, Teisen MN, Edslev SM, Petersen DL, Aljubouri A, Christensen C et al. 2018. NCAM2 Fibronectin type-III domains form a rigid structure that binds and activates the fibroblast growth factor receptor. Sci Rep. 8:8957.
- Sanchez-Huertas C, Freixo F, Viais R, Lacasa C, Soriano E, Luders J. 2016. Non-centrosomal nucleation mediated by augmin organizes microtubules in post-mitotic neurons and controls axonal microtubule polarity. Nat Commun. 7: 12187.
- Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. Prog Neurobiol. 61:133–168.
- Sarmiere PD, Bamburg JR. 2004. Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. J Neurobiol. 58:103–117.
- Schelski M, Bradke F. 2017. Neuronal polarization: from spatiotemporal signaling to cytoskeletal dynamics. Mol Cell Neurosci. 84:11–28.
- Scholz C, Steinemann D, Malzer M, Roy M, Arslan-Kirchner M, Illig T, Schmidtke J, Stuhrmann M. 2016. NCAM2 deletion in a boy with macrocephaly and autism: cause, association or predisposition? *Eur J Med Genetics*. 59:493–498.
- Shah B, Puschel AW. 2014. In vivo functions of small GTPases in neocortical development. Biol Chem. 395:465–476.
- Sheng L, Leshchyns'ka I, Sytnyk V. 2013. Cell adhesion and intracellular calcium signaling in neurons. Cell Commun Signal. 11:94.
- Sheng L, Leshchyns'ka I, Sytnyk V. 2015. Neural cell adhesion molecule 2 promotes the formation of filopodia and neurite branching by inducing submembrane increases in Ca2+ levels. J Neurosci. 35:1739–1752.
- Sheng L, Leshchyns'ka I, Sytnyk V. 2019. Neural cell adhesion molecule 2 (NCAM2)-induced c-Src-dependent propagation of submembrane Ca2+ spikes along dendrites inhibits synapse maturation. Cereb Cortex. 29:1439–1459.
- Simo S, Jossin Y, Cooper JA. 2010. Cullin 5 regulates cortical layering by modulating the speed and duration of Dab1-dependent neuronal migration. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. 30: 5668–5676.
- Skaper SD, Kee WJ, Facci L, Macdonald G, Doherty P, Walsh FS. 2000. The FGFR1 inhibitor PD 173074 selectively and potently antagonizes FGF-2 neurotrophic and neurotropic effects. J Neurochem. 75:1520–1527.
- Sluchanko NN, Gusev NB. 2010. 14-3-3 proteins and regulation of cytoskeleton. Biochemistry. 75:1528–1546.
- Sogawa Y, Yoshimura Y, Yamauchi T. 2001. Investigation of the Ca(2+)-independent form of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in neurite outgrowth. Brain Res Brain Res Protocol. 8:159–169.
- Soroka V, Kasper C, Poulsen FM. 2010. Structural biology of NCAM. Adv Exp Med Biol. 663:3–22.

- Soroka V, Kolkova K, Kastrup JS, Diederichs K, Breed J, Kiselyov VV, Poulsen FM, Larsen IK, Welte W, Berezin V et al. 2003. Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. Structure. 11:1291–1301.
- Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Schachner M. 2017. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily regulate synapse formation, maintenance, and function. Trends Neurosci. 40:295–308.
- Takano T, Xu C, Funahashi Y, Namba T, Kaibuchi K. 2015. Neuronal polarization. Development. 142:2088–2093.
- Tas RP, Chazeau A, Cloin BMC, Lambers MLA, Hoogenraad CC, Kapitein LC. 2017. Differentiation between oppositely oriented microtubules controls polarized neuronal transport. *Neuron*. 96:1264–1271 e1265.
- von Campenhausen H, Yoshihara Y, Mori K. 1997. OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. NeuroReport. 8:2607–2612.
- Westphal DS, Andres S, Makowski C, Meitinger T, Hoefele J. 2018. MAP2—a candidate gene for epilepsy, developmental delay

and behavioral abnormalities in a patient with microdeletion 2q34. Front Genet. 9:99.

- Winther M, Berezin V, Walmod PS. 2012. NCAM2/OCAM/RNCAM: cell adhesion molecule with a role in neuronal compartmentalization. Int J Biochem Cell Biol. 44:441–446.
- Witte H, Neukirchen D, Bradke F. 2008. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. J Cell Biol. 180: 619–632.
- Xu X, Jaehne EJ, Greenberg Z, McCarthy P, Saleh E, Parish CL, Camera D, Heng J, Haas M, Baune BT et al. 2015. 14-3-3zeta deficient mice in the BALB/c background display behavioural and anatomical defects associated with neurodevelopmental disorders. Sci Rep. 5:12434.
- Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Fujita H, Hayashi H, Kagamiyama H, Mori K. 1997. OCAM: a new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. J Neurosci. 17:5830–5842.
- Zinn K, Ozkan E. 2017. Neural immunoglobulin superfamily interaction networks. Curr Opin Neurobiol. 45:99–105.



"Nothing in life is to be feared; it is only to be understood."

Marie Sklodowska-Curie

New Partners Identified by Mass Spectrometry Assay Reveal Functions of NCAM2 in Neural Cytoskeleton Organization

Antoni Parcerisas^{1,2,3,*,†} Alba Ortega-Gascó^{1,2,*}, Marc Hernaiz-Llorens^{1,2}, Maria Antonia Odena⁴, Fausto Ulloa^{1,2}, Eliandre de Oliveira⁴, Miquel Bosch³, Lluís Pujadas^{1,2} i Eduardo Soriano^{1,2,†}

¹ Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunulogia, Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

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

³ Departament de Ciències Bàsiques, Universitat Internacional de Catalunya, 08195 Sant Cugat del Vallès, Espanya.

⁴ Plataforma de Proteòmica, Parc Científic de Barcelona (PCB), 08028, Barcelona, Espanya.

* Els autors hi han contribuït equitativament.

RESUM

La Molècula d'Adhesió Neuronal 2 (NCAM2; de Neural Cell Adhesion Molecule 2) és una proteïna de membrana amb un paper important en el desenvolupament morfològic de les neurones. En el còrtex i l'hipocamp, la NCAM2 és essencial per la diferenciació neuronal, el creixement dendrític i axonal, i la formació de sinapsis. Tot i així, els mecanismes a partir dels quals de la NCAM2 vehicula les seves funcions; així com les proteïnes amb les quals interacciona durant el desenvolupament del cervell no es coneixen amb profunditat. En aquest estudi hem detectat la interacció de NCAM2 amb més de 100 proteïnes implicades en nombrosos processos, que inclouen la morfogènesi neuronal i la sinaptogènesi. Les interaccions més rellevants amb els neurofilaments, la proteïna associada als microtúbuls 2 (MAP2; de Microtubul-associated protein 2), la quinasa calci/calmodulina II (CaMKII; de Calcium/calmodulin kinase II), l'actina i Nogo han estat validades. Una anàlisi in silico de la cua citoplasmàtica de la NCAM2.1 ha revelat diferents motius susceptibles de fosforil·lació a través dels quals la NCAM2 es podria unir als seus interactors. Els nostres resultats expandeixen el coneixement sobre l'interactoma de la NCAM2 i confirmen el paper destacat de la proteïna en l'organització del citoesquelet, la morfogènesi neuronal i la sinaptogènesi. Aquestes dades permeten explicar els fenotips observats en diferents patologies que presenten alteracions en el gen *Ncam2*.

Aquest article ha estat publicat a la revista International Journal of Molecular Sciences, 9 de juliol de 2021.

Parcerisas, A., Ortega-Gascó, A., Hernaiz-Llorens, M., Odena, M. A., Ulloa, F., de Oliveira, E., Bosch, M., et al. (2021). New Partners Identified by Mass Spectrometry Assay Reveal Functions of NCAM2 in Neural Cytoskeleton Organization. International Journal of Molecular Sciences, 22(14), 7404. MDPI AG. Retrieved from http://dx.doi.org/10.3390/ijms22147404



Article New Partners Identified by Mass Spectrometry Assay Reveal Functions of NCAM2 in Neural Cytoskeleton Organization

Antoni Parcerisas ^{1,2,3},*,[†], Alba Ortega-Gascó ^{1,2,†}, Marc Hernaiz-Llorens ^{1,2}, Maria Antonia Odena ⁴, Fausto Ulloa ^{1,2}, Eliandre de Oliveira ⁴, Miquel Bosch ³, Lluís Pujadas ^{1,2} and Eduardo Soriano ^{1,2,*}

- ¹ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Barcelona and Institute of Neurosciences, 08028 Barcelona, Spain; albaortega@ub.edu (A.O.-G.); marchernaiz@gmail.com (M.H.-L.); fausto.ulloa@ub.edu (F.U.); lluis.pujadas@ub.edu (L.P.)
- ² Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain
- ³ Department of Basic Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, 08195 Sant Cugat del Vallès, Spain; miquelbosch@uic.es
- Plataforma de Proteòmica, Parc Científic de Barcelona (PCB), 08028 Barcelona, Spain; maodena@pcb.ub.es (M.A.O.); eoliveira@pcb.ub.es (E.d.O.)
- Correspondence: aparcerisas@uic.cat (A.P.); esoriano@ub.edu (E.S.)
- + A.P. and A.O.-G. contributed equally.

Abstract: Neuronal cell adhesion molecule 2 (NCAM2) is a membrane protein with an important role in the morphological development of neurons. In the cortex and the hippocampus, NCAM2 is essential for proper neuronal differentiation, dendritic and axonal outgrowth and synapse formation. However, little is known about NCAM2 functional mechanisms and its interactive partners during brain development. Here we used mass spectrometry to study the molecular interactome of NCAM2 in the second postnatal week of the mouse cerebral cortex. We found that NCAM2 interacts with >100 proteins involved in numerous processes, including neuronal morphogenesis and synaptogenesis. We validated the most relevant interactors, including Neurofilaments (NEFs), Microtubule-associated protein 2 (MAP2), Calcium/calmodulin kinase II alpha (CaMKII α), Actin and Nogo. An in silico analysis of the cytosolic tail of the NCAM2.1 isoform revealed specific phosphorylation site motifs with a putative affinity for some of these interactors. Our results expand the knowledge of NCAM2 interactome and confirm the key role of NCAM2 in cytoskeleton organization, neuronal morphogenesis and synaptogenesis. These findings are of interest in explaining the phenotypes observed in different pathologies with alterations in the NCAM2 gene.

Keywords: NCAM2; mass spectrometry; cytoskeleton; neuronal morphogenesis; MAP2; CaMKIIα; Neurofilaments; Nogo

1. Introduction

Neuronal differentiation, and the establishment of cell polarity and synaptic connections, are crucial events for the development of the brain [1,2]. These processes are tightly regulated by numerous factors, including cytoskeleton proteins, membrane receptors and elements of the extracellular matrix. Cell Adhesion Molecules (CAMs) are a family of membrane proteins with many functions that transduce extracellular and membrane-bound signals into cellular events, such as membrane remodeling, cytoskeletal rearrangement and dynamics, vesicular transport, gene expression and cell survival [3–5].

The immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules (IgSF CAM) includes more than 50 different members in mammals [6]. IgSF CAMs are characterized by an extracellular region with one or several immunoglobulin-like (Ig) domains, followed by fibronectin type III (Fn3) domains. Most IgSF CAMs present a single transmembrane domain with an intracellular tail, while other members are anchored to the cell membrane through a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor [7]. Typically, the extracellular and



Citation: Parcerisas, A.; Ortega-Gascó, A.; Hernaiz-Llorens, M.; Odena, M.A.; Ulloa, F.; de Oliveira, E.; Bosch, M.; Pujadas, L.; Soriano, E. New Partners Identified by Mass Spectrometry Assay Reveal Functions of NCAM2 in Neural Cytoskeleton Organization. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7404. https:// doi.org/10.3390/ijms22147404

Academic Editor: Thomas Fath

Received: 15 June 2021 Accepted: 7 July 2021 Published: 9 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). the intracellular domains of IgSF CAMs interact with several proteins, ligands or modifiers, which determine their important roles during development [5,8,9].

The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) family has two members, NCAM1 and NCAM2 [10,11]. Both proteins present a similar extracellular structure with five Ig domains and two Fn3 domains. NCAM1 has three different isoforms (180, 140 and 120 KDa), whereas NCAM2 has two isoforms: NCAM2.1 (with a transmembrane domain and a cytoplasmic tail) and NCAM2.2 (a shorter isoform with no transmembrane domain but a GPI-anchor motif) [12,13].

A large number of studies have investigated the functions of NCAM1, which play a fundamental role in both neural development and plasticity [8,14,15]. NCAM1 interacts with many extracellular ligands and adaptors, such as the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR), Prion Protein (PRNP), Homer1, Tyrosine-protein kinase Fyn or Focal adhesion kinase 1 (FAK) [16-20]. By contrast, NCAM2 is less studied. NCAM2 is widely expressed in the Central Nervous System (CNS) during brain development. In the olfactory system NCAM2 is necessary for the formation and maintenance of dendritic and axonal compartments [21–26], and in synapse formation and maintenance [26–28]. Genetic studies suggest that the NCAM2 gene is implicated in the intellectual disability phenotype in Down syndrome and Autism Spectrum Disorders, as well as in other neurodevelopmental diseases [24,29-32]. In addition, NCAM2 has been involved in synaptic deficits in Alzheimer's disease [28]. Although NCAM2 functions have begun to be clarified [25,26,28], the extracellular ligands and intracellular adaptors that interact with NCAM2 remain largely unknown. It has been recently shown that NCAM2 regulates neurite outgrowth through the kinase Src in the cerebral cortex [26,27], and that it mediates dendritic morphogenesis via the formation of molecular complexes with Microtubule-associated protein 2 (MAP2) and 14-3-3 family proteins [25].

To gain insight into NCAM2 functions, here we investigate the interactome of the NCAM2 protein during postnatal cortical development using proteomic and molecular approaches. We found more than 100 proteins that interact with NCAM2 using mass spectrometry. We further validated the more relevant interactions for cytoskeleton organization (CaMKII α , NEFs, Actin and MAP2) by means of immunoprecipitation. To better characterize the NCAM2 interactome, our proteomic data were analyzed by bioinformatic tools; we detected significant enrichments in gene ontology terms and in cellular pathways linked to the cytoskeleton, as well as to other important neural functions. In addition, we identify putative phosphorylation sites of the NCAM2.1 cytosolic tail using in silico analysis. These data increase our knowledge about the interactome of the NCAM2 protein and open new perspectives for the study of NCAM2 functions.

2. Results

2.1. In Silico Analysis of the Cytoplasmic Domains of NCAM2.1

Previous studies showed the importance of the cytoplasmic domains of CAMs, such as NCAM1 (NCAM140 or NCAM180 isoforms). We thus performed a structural analysis of the amino acid sequence of the NCAM2.1 cytosolic domain (Figure 1A). The residues S765, T780 and S786 have already been described as phosphorylation sites [33]. We used different bioinformatic tools (Scansite 4.0 and Disphos 1.3 analysis, Koch Institute and MIT, Cambridge, MA, USA) to identify additional phosphorylatable residues. High scores for S746 and T818, which match the consensus sequences of 14-3-3 ζ and CaMKII γ , respectively, were detected with Scansite 4.0. Disphos analysis showed that approximately 70% (12/17) of the phosphorylatable residues have significant scores to be phosphorylated (serines 7/9, threonines 4/7 and tyrosine 1/1), as shown in Figure 1B–D. We also detected different motifs that match the consensus sequences of the kinases Cyclin dependent kinase 5 (CDK5), Protein kinase C alpha (PRKCA), Casein kinase II (CSNK2) and Glycogen synthase 3 (GSK3), using Scansite. These are kinases known to phosphorylate other CAMs, such as Cadherins, Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), Integrins or Neuronglia cell adhesion molecule (NgCAM) [34–39].



DVSCFFIRQCGLLMCITRRMCGKKSGSSGKSKELEEGKAAYLKDGSKEPIVEMRTEDERITNHEDGSPVNEPNETTPLTEPEKLPLKEENGKEVLNAETIEIKVSNDIIQSKEDDIKA

н		

Ε

Position	Residue	Score	Sequence	Motif gene
736	Т	0.7996	LMCITRRMC	NEK4
736	Т	0.6993	LMCITRRMC	NEK5
736	Т	0.834	LMCITRRMC	NEK8
746	S	0.5038	KKSG <mark>S</mark> SGKS	PRKCA
746	S	0.592	KKSG <mark>S</mark> SGKS	YWHAZ
747	S	0.5239	KSGS <mark>S</mark> GKSK	PRKCA
747	S	0.6996	KSGS <mark>S</mark> GKSK	NEK1
747	S	0.7851	KSGS <mark>S</mark> GKSK	NEK4
768	Р	0.7004	GSKEPIVEM	ITK
774	Т	0.5288	VEMRTEDER	CSNK2B
780	Т	0.6831	DERITNHED	AURKB
786	S	0.5619	HEDGSPVNE	CSNK2B
786	S	0.6251	HEDGSPVNE	CDK1
786	S	0.5828	HEDGSPVNE	CDK5
786	S	0.6616	HEDGSPVNE	CDK1
786	S	0.6424	HEDG <mark>S</mark> PVNE	CDK1
794	Т	0.5819	EPNETTPLT	GSK3A
794	Т	0.5145	EPNETTPLT	GSK3B
794	Т	0.7775	EPNETTPLT	NEK6
795	Т	0.5935	PNETTPLTE	MAPK3
795	Т	0.5921	PNETTPLTE	CDK1
795	Т	0.569	PNETTPLTE	CDK1
798	Т	0.4821	TTPLTEPEK	CSNK1G2
798	Т	0.6293	TTPLTEPEK	MAPK3
818	Т	0.5951	LNAETIEIK	CAMK2G



NCAM140 (730-752) DITCYFLNKCGLLMCI AVNL CGK Homology(57%) D+ C+F CGLLMCI +CGK NCAM2.1 (720-742) DVSCFFIRQCGLLMCITRRMCGK

F				
1	Protein	Position	Peptide sequence	Score (cutoff)
	NCAM140	4	****DITCYFLNKCG	13.011 (10.722)
	NCAM2.1	4	****DVSCFFIRQCG	18.683(10.722)
	NCAM140	10	TCYFLNKCGLLMCIA	19.422 (10.722)
	NCAM2.1	10	SCFFIRQCGLLMCIT	5.853(2.412)
	NCAM140	15	NKCGLLMCIAVNLCG	5.264 (2.412)
	NCAM2.1	15	RQCGLLMCITRRMCG	29.502(3.717)
	NCAM140	21	MCIAVNLCGKAGPGA	10.434(3.717)
	NCAM2.1	21	MCITRRMCGKKSGSS	9.68(3.717)

Figure 1. In silico analysis of NCAM2.1 cytoplasmatic domain. (A) Schematic representation of phosphorylation sites in NCAM2.1 cytoplasmatic tail amino acid sequences. Serine (red), Tyrosine (green) and Threonine (blue) phosposites are represented. * phosphorylated sites previously described. (B) In silico analysis using Scansite 4.0 to identify motifs gene interactors (motif gene) that are likely to be phosphorylated by specific protein kinases or binding domains such as SH2 domains, 14-3-3 domains or PDZ. (C,D) Schematic representation and Table of phosphorylation sites of NCAM2 cytoplasmatic tail with their in silico predicted scores using Disphos. (E) Comparison of NCAM140 (730-752 amino acids) and NCAM2.1 (719-741 amino acids) sequences, NCAM1 has an intracellular region with palmitoylation modification sites that contain cysteine-residues which are critical for its localization in lipid rafts and also present in NCAM2.1 cytoplasmatic domain (#). (F) In silico analysis of NCAM2.1 and NCAM1 with their predicted scores using CSS-Palm software 4.0. NCAM2.1 contains the same potential palmitoylation sites similarly to NCAM1 with high scores (G) WB of NCAM2.1 from cortical extracts subjected to sucrose gradient. NCAM2.1 co-signals in lipid rafts (lanes 4-5, DRM, Detergent-resistant membrane, identified by Flotillin and Caveolin), but mainly outside lipids rafts (lanes 6–12, HF, High Fraction).

1

2 3 DRM

4 5 7 8 9 10 11 12

HE

CAMs are known to have different roles depending on their membrane localization in lipids rafts [40–43], as in the case of NCAM140. Since the NCAM2 molecule is a paralog of NCAM1, we decided to compare the intracellular domains of NCAM140 and NCAM2.1. Although the cytoplasmic domain sequences of both proteins share an homology of 54% (65/120 amino acids, data not shown), the phosphorylation sites are not found in the homologous regions. Therefore, we focused on the comparison of the NCAM1 sequences responsible for lipid raft localization, corresponding to 730-752 amino acids [41], with their homologous regions in NCAM2.1 (Figure 1E). NCAM1 has an intracellular region with palmitoylation modification sites that contains cysteine-residues that are critical for NCAM1 targeting to lipid rafts. We observed the presence of four similar cysteine residues in the homologous region of NCAM2.1, suggesting that these conserved residues could be implicated in lipid raft localization (Figure 1E). Using CSS-Palm 4.0 software (Sun Yat-sen University, Guangzhou, China), we detected with high scores the same palmitoylation sites in NCAM2.1 and NCAM1 (Figure 1F). In order to confirm the NCAM2.1 localization in lipid rafts, we analyzed the expression of NCAM2.1 by Western blot (WB) in cortical extracts subjected to sucrose gradient (Figure 1G). We found that NCAM2.1 co-localized with lipid raft markers (lanes 4–5), but was predominantly expressed outside lipids rafts (lines 6-12).

2.2. NCAM2 Interactome in Postnatal Cerebral Cortex

We performed protein immunoprecipitation and peptide detection as described [25] in Figure 2A. The membrane fraction was isolated from the cerebral cortex of postnatal P12–15 mice (Figure 2B) and NCAM2 was purified by immunoprecipitation with two different antibodies, one recognizing the cytoplasmic tail of NCAM2.1 (EB06991, Everest, Oxfordshire, UK), and the other recognizing the extracellular region of both NCAM2 isoforms (AF778, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). We used non-conjugated magnetic beads for control immunoprecipitations. Our data first confirmed the specific interaction of NCAM2.1 with NCAM2.2 as shown in Figure 2C. Immunoprecipitated proteins were then eluted and digested for mass spectrometry analysis. The resulting peptides were identified by LC-MS/MS to obtain putative protein partners (False Discovery Rate $\leq 0.01\%$) as represented in Figure 2A and Table S1.

We detected 103 proteins that specifically interact with NCAM2 (Table S1) and 52 of them were identified with two or more different peptides (Table 1). Many of the peptides corresponded to microtubule, intermediate filaments or Actin cytoskeletal proteins (i.e., Actin, ACTB; Tubulin beta-4A, TUBB4A; Alpha-internexin, INA; Tubulin alpha-1A, TUBA1A; Tubulin alpha-1C, TUBA1C; Neurofilament light polypeptide, NEFL; Neurofilament medium polypeptide, NEFM; and Tubulin beta-6 chain, TUBB6) and to cytoskeletonassociated proteins (i.e., Microtubule-associated protein 2, MAP2; Microtubule-associated protein 1B, MAP1B; F-actin-capping protein beta, CAPZB; and F-actin-capping protein alpha-2, CAPZA2). Interestingly, the analysis also detected the interaction with motor proteins (i.e., Dynein light chain 1, DYNLL1; Myosin light polypeptide 6, MYL6; and Dynein light chain 2, DYNLL2), kinases and adapter proteins (i.e., CaMKII family proteins and 14-3-3 family proteins), calcium-binding proteins (i.e., CaMKII family proteins, Calumenin, CALU; Reticulocalbin-2, RCN2; Calmodulin, CALM1; and Hippocalcin-like protein 1, HPCAL1) and transcription activity regulators (i.e., Elongation factor 1-beta, EEF1B; Nuclease-sensitive element-binding protein 1, YBX1; Elongation factor 1-delta, EEF1D; and Eukaryotic translation initiation factor 3 H, EIF3H).



Figure 2. The interactome of NCAM2; the mass spectrometry approach. (A) Schematic representation of the mass spectrometry approach. Brain lysates from P10–12 mice were enriched in membrane proteins and incubated with magnetic beads, which were previously conjugated with an antibody against NCAM2.1 or against both NCAM2 isoforms. The eluted proteins were processed for mass spectrometry analysis. A list of 103 proteins that interact with NCAM2 was obtained with a False Discovery Rate $\leq 0.01\%$, Table 1. (B) WB detection of NCAM2.1 and NCAM2 proteins in the cytosolic, membrane and insoluble fractions of the brain lysates used for the mass spectrometry assay. NCAM2.1 isoform is detected in both fractions, the membrane and the insoluble fraction while NCAM2.2 is specially enriched in the insoluble fraction. Tubulin was used as a loading control. (C) WB detection of NCAM2 from samples of magnetic beads elution.

Protein (Gene)	Ptd	Function
Microtubule-associated protein 2 (Map2)	24	actin binding, calmodulin binding, cytoskeletal regulatory, microtubule binding and protein kinase binding
Neurofilament light polypeptide (Nefl)	20	structural constituent of cytoskeleton andstructural constituent of postsynaptic intermediate filament cytoskeleton
Actin, cytoplasmic 1 (Actb)	19	structural constituent of cytoskeleton and structural constituent of postsynaptic actin cytoskeleton
Neurofilament medium polypeptide (Nefm)	19	microtubule binding and structural constituent of cytoskeleton
Tubulin beta-4A (Tubb4a)	18	structural constituent of cytoskeleton and GTPase activity
Alpha-internexin (Ina)	17	structural constituent of cytoskeleton, structural constituent of postsynaptic actin and intermediate filament cytoskeleton
Tubulin alpha-1A (Tuba1a)	13	structural constituent of cytoskeleton
Tubulin alpha-1C (Tuba1c)	12	structural constituent of cytoskeleton
Actin, alpha cardiac muscle 1 (Actc1)	11	structural constituent of cytoskeleton and myosin binding
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II beta (Camk2b)	11	calmodulin-dependent protein kinase activity, protein serine/threonine kinase activity and structural constituent of postsynaptic actin cytoskeleton
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha(Camk2a)	10	calmodulin-dependent protein kinase activity, glutamate receptor binding and protein serine/threonine kinase activity
Microtubule-associated protein 1B (Map1b)	9	actin binding, cytoskeletal regulatory protein and binding
Beta-actin-like protein 2 (Actbl2)	8	structural constituent of postsynaptic actin cytoskeleton

Table 1. The interactome of NCAM2.

Table 1. Cont.

Protein (Gene)	Ptd	Function
F-actin-capping protein beta (Capzb)	8	actin binding and beta-tubulin binding
14-3-3 protein zeta/delta (Ywhaz)	8	recognition of a phosphoserine or phosphothreonine motif
Tubulin beta-6 chain (Tubb6)	7	structural constituent of cytoskeleton
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta (Camk2d)	6	calmodulin-dependent protein kinase activity and protein serine/threonine kinase activity
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma (Camk2g)	6	calmodulin-dependent protein kinase activity and protein serine/threonine kinase activity
Enhancer of rudimentary homolog (Erh)	5	Cell cycle
Thioredoxin-dependent peroxide reductase (Prdx3)	5	cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process
Heat shock cognate 71 kDa protein (Hspa8)	5	protein quality control system (folding proteins and degredation), co-chaperone, signaling receptor binding and ubiquitin protein ligase binding
F-actin-capping protein alpha-2 (Capza2)	4	actin filament binding
Calumenin (Calu)	4	calcium ion binding and enzyme inhibitor activity
Heat shock factor-binding protein 1 (Hsbp1)	3	transcription corepressor activity
Granulins (Grn)	3	chaperone binding, cytokine activity, growth factor activity and RNA binding
Reticulocalbin-2 (Rcn2)	3	calcium ion binding
Elongation factor 1-beta (Eef1b)	3	guanyl-nucleotide exchange factor activity and translation elongation factor activity
14-3-3 protein epsilon (Ywhae)	3	recognition of a phosphoserine or phosphothreonine motif
Hemoglobin beta-1 (Hbb-b1)	3	oxygen carrier activity
Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (Ybx1)	3	DNA-binding transcription activator, transcription factor binding
Elongation factor 1-delta (Eef1d)	3	activating transcription factor bindingand translation elongation factor activity
Dynein light chain 1, cytoplasmic (Dynll1)	2	motor activity and scaffold protein binding
Myosin light polypeptide 6 (Myl6)	2	motor activity and actin-dependent ATPase activity
Barrier-to-autointegration factor (Banf1)	2	DNA binding and enzyme binding
Dynein light chain 2, cytoplasmic (Dynll2)	2	motor activity and scaffold protein binding
60S acidic ribosomal protein P2 (Rplp2)	2	structural constituent of ribosome
Complement component 1 Q (C1qbp)	2	complement component C1q binding, mRNA binding and translation activator
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 (Itih3)	2	binding protein between hyaluronan and other matrix protein
Reticulon-4 (Rtn4)	2	cadherin binding and neurite growth regulatory factor
Ig kappa chain V-III region PC 2413 (Kv3a5)	1	adaptive immune response
Ataxin-10 (Atxn10)	1	neuritogenesis
Protein LSM12 homolog (Lsm12)	1	interactor/competitor of ATXN2
Eukaryotic translation initiation factor 3 H (Eif3h)	1	translation initiation factor activity
Annexin A2 (Anxa2)	1	calcium-dependent phospholipid and cytoskeletal protein binding
Calmodulin (Calm1)	1	calcium-dependent protein and protein kinase binding

Table 1. Cont.

Protein (Gene)	Ptd	Function
FAST kinase domain-containing protein 2 (Fastkd2)	1	protein kinase activity
Haptoglobin (Hp)	1	hemoglobin binding
Hippocalcin-like protein 1 (Hpcal1)	1	calcium ion binding
Ras-related protein Rab-33A (Rab33a)	1	GTPase activity
Ubiquitin-protein ligase E3B (Ube3b)	1	ubiquitin conjugating enzyme activity

Proteins identified by LC-MS/MS in the NCAM2-immunoprecipitated cerebral cortex of postnatal mice samples obtained with a False Discovery Rate \leq 0.01% and detected with two or more peptides. The table shows the proteins, the number of different peptides (Ptd) found from each protein and the function of the proteins.

A total number of 16 proteins were detected with both NCAM2 antibodies, and 20 proteins were detected in both independent experiments (Table 1 and Table S2). Moreover, seven out of these 20 proteins were also detected with both antibodies (ACTB, TUBA1A, HSPA8, HSBP1, GRN and DYNLL1). Specifically, Actin (ACTB), Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8) and Granulin (GRN) proteins were identified in all the replicates and with all antibodies, confirming the strong reliability of these detected interactions (Table 1 and Table S2). Additionally, mass spectrometry analysis showed different protein coverage among the detected NCAM2 interactors (Table 1 and Table S2).

2.3. NCAM2 Interacts with Cytoskeleton and Cytoskeleton-Associated Proteins

Mass spectrometry analysis identified some proteins with high robustness. These proteins are MAP2, Neurofilaments, and CaMKII. MAP2 is the protein with the largest number of peptides detected in the present analysis. We already described the interaction of MAP2 with NCAM2 (Figure 3A,B), as well as the interaction of NCAM2 with 14-3-3 family proteins (Figure 3C,D).

We previously reported that NCAM2 regulates microtubule polymerization and stability [25]. The present data show that NCAM2 additionally interacts with different key cytoskeletal components. The cytoskeleton proteins ACTB, TUBA1A and ACTC1 were detected in different replicates. We confirmed the NCAM2-Actin interaction by immunoprecipitation, IP, using specific antibodies for NCAM2 (Figure S1). Besides the interaction with Actin filaments, our results detected the interaction of NCAM2 with CAPZA and CAPZB, Actin-interacting proteins forming a heterodimer that binds to the barbed-ends of Actin filaments, which block their polymerization and depolymerization [44,45]. CAPZ proteins play a relevant role in growth cone dynamics, dendritic spine development and synapse formation [46,47].

A large number of peptides corresponding to NEFL and NEFM were identified in the different experiments. Neurofilaments are important for the radial growth and the stability of axons and enable effective and high-velocity nerve conduction [48,49]. The NCAM2-NEFs interactions were validated by IP and WB (Figure 3E).

The CaMKII family of proteins was also identified with different peptides. CaMKII α and CaMKII β play crucial roles in neuronal morphogenesis and plasticity [1,50,51]. Previous results showed the functional relation between NCAM2 and CaMKII, important for neurite branching and filopodia formation [26]. Here, our results show a direct interaction between these proteins, validated by IP and WB as shown in Figure 3F.

We detected Reticulon 4 (Nogo) with more than one peptide when the NCAM2.1 isoform was immunoprecipitated. The Nogo-NCAM2.1 interaction was additionally assessed by immunoprecipitation of Nogo and NCAM2 detection by WB (Figure 3G). Nogo proteins are important for neuron migration and neurite outgrowth and branching [52].



Figure 3. NCAM2 interacts with MAP2, 14-3-3, NFs, CaMKII and Nogo. (**A**) WB detection of NCAM2.1 in different co-immunoprecipitation experiments with MAP2 (**A**), 14-3-3 (**C**), NEFs (**E**), CaMKII (**F**) or NEFs (**G**). Detection of MAP2 (**B**) or 14-3-3 (**D**) in different co-immunoprecipitation experiments with NCAM2.1 from P10–15 mouse cortex and hippocampal protein extracts. Immunoprecipitation using MAP2 (**A**), 14-3-3 (**C**), NEFs (**E**) or CaMKII (**F**) or Nogo (**G**) antibodies confirmed the presence of NCAM2.1 protein in the WBs after detection with NCAM2.1 or NCAM2 antibodies (**G**). Immunoprecipitation using NCAM2.1 antibodies confirmed the presence of MAP2 (**B**) and 14-3-3 (**D**).

Finally, Heat shock cognate 71 kDa protein and Granulin were detected in all conditions. HSPA8 is a member of the chaperon family and participates together with HSC70 in protein folding and degradation, stress response and chaperone-mediated autophagy [53,54]. GRN is a secreted growth factor involved in different neurological functions.

2.4. Bioinformatic Analysis of the NCAM2 Interactome

A bioinformatic analysis was performed with the 52 proteins detected with two or more peptides using String 11.0 (Elixir, Hinxton, Cambridgeshire, UK). [55].

2.4.1. Bit Map

To visualize the proteomic results, we obtained a high quality graphic of NCAM2 interactions in bitmap format, showing a significant increased number of edges: 93 edges with our pull versus 22 expected in random condition (Figure 4). This significant increase shows that NCAM2 interacts with different protein complex previously described.



Figure 4. NCAM2 protein interaction network. Bitmap representation of the NCAM2 interaction network. The network edges mean the evidence of interactions between the proteins of Table 1, proteins detected with two or more peptides in the mass spectrometry assay. Our bitmap shows a significant increased number of edges, 93 edges with our pull versus 22 expected in random condition.

2.4.2. Gene Ontology Terms

We next performed Gene Ontology (GO) and pathway enrichment analyses. We found a significant enrichment for Biological Process (Table 2 and Table S3); Molecular Function (Table 2 and Table S4); and Cellular Components GO terms (Table 2 and Table S5). Focusing on Biological Process GO terms, our results show that the partners of NCAM2 are significantly enriched in 118 biological process terms (Table 2 and Table S3), including

cell differentiation and neuronal morphogenesis. Moreover, NCAM2 interactors are significantly enriched in GO terms linked to cytoskeleton, corroborating the above findings. We also found terms related to the organization and localization of plasma membrane proteins.

Table 2. Gene Ontology (GO) terms enriched for Biological Process, Molecular Function and Cellular Components in the NCAM2 interactors.

GOs Enrichment for Biological Process				
GO	Term Description	Proteins		
GO:0030030	cell projection organization	Actb,Atxn10,Camk2a,Camk2b,Capzb,Dynll1,Dynll2,Map1b, Map2,Nefl,Nefm,Rtn4,Tubb4a		
GO:0007010	cytoskeleton organization	Actb,Actc1,Capzb,Ina,Map1b,Map2,Nefl,Nefm,Tuba1a, Tub1c,Tubb4a,Tubb6		
GO:0007017	microtubule-based process	Dynll1,Dynll2,Map1b,Map2,Nefl,Nefm,Tuba1a,Tuba1c, Tubb4a,Tubb6		
GO:0060052	neurofilament cytoskeleton organization	Ina,Nefl,Nefm		
GO:0010769	regulation of cell morphogenesis involved in differentiation	C1qbp,Camk2b,Map1b,Map2,Nefl,Nefm,Rtn4		
GO:0007399	nervous system development	Actb,Atxn10,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g,Capzb,Grn, Ina,Map1b,Map2,Nefl,Nefm,Rtn4,Ywhae,Ywhag		
GO:0010970	transport along microtubule	Dynll1,Dynll2,Map1b,Nefl,Nefm		
GO:0031175	neuron projection development	Actb,Atxn10,Camk2a,Capzb,Map1b,Map2,Nefl,Nefm,Rtn4		
GO:0048699	generation of neurons	Actb,Atxn10,Camk2a,Camk2b,Capzb,Grn,Map1b,Map2, Nefl, Nefm,Rtn4,Ywhae,Ywhag		
GO:0006414	translational elongation	Eef1b2,Eef1d,Rplp2		
GO:0050770	regulation of axonogenesis	Map1b,Map2,Nefl,Nefm,Rtn4		
GO:0061564	axon development	Actb,Map1b,Map2,Nefl,Nefm,Rtn4		
GO:0045664	regulation of neuron differentiation	Camk2b,Grn,Map1b,Map2,Nefl,Nefm,Rtn4,Ywhag		
GO:0010975	regulation of neuron projection development	Camk2b,Grn,Map1b,Map2,Nefl,Nefm,Rtn4		
GOs enrichment for Molecular Function				
GO	Term Description	Proteins		
GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	Actb,Nefl,Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a,Tubb6		
GO:0005198	structural molecule activity	Actb,Ina,Myl6,Nefl,Nefm,Rplp2,Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a, Tubb6		
GO:0004683	calmodulin-dependent protein kinase activity	Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g		
GO:0008092	cytoskeletal protein binding	Actb,Actc1,Anxa2,Camk2d,Capza2,Capzb,Dynll1,Dynll2, Map1b,Map2,Ywhag		
GO:0005519	cytoskeletal regulatory protein binding	Map1b,Map2		
GO:0044325	ion channel binding	Calm1,Camk2d,Ywhae,Ywhaz		
GO:0003924	GTPase activity	Rab33a,Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a,Tubb6		
GO:0005509	calcium ion binding	Anxa2,Calm1,Calu,Hpcal1,Myl6,Rcn2,Tubb4a		
GO:0097110	scaffold protein binding	Dynll1,Dynll2,Ywhae		
GO:0003746	translation elongation factor activity	Eef1b2,Eef1d		
GOs enrichment for Cellular Component				
---------------------------------------	---	--	--	
GO	Term Description	Proteins		
GO:0005856	cytoskeleton	Actb,Actbl2,Actc1,Calm1,Camk2b,Capza2,Capzb,Dynll1, Dynll2,Hsbp1,Hspa8,Ina,Map1b,Map2,Myl6,Nefl,Nefm, Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a,Tubb6,Ywhae		
GO:0099513	polymeric cytoskeletal fiber	Actc1,Capzb,Dynll1,Dynll2,Hspa8,Ina,Map1b,Map2,Nefl, Nefm, Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a,Tubb6		
GO:0014069	postsynaptic density	Actb,Camk2a,Camk2b,Camk2g,Hspa8,Map1b,Map2,Nefm, Rtn4,Ywhaz		
GO:0043005	neuron projection	Actb,Atxn10,Calm1,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g, Capzb,Dynll1,Hspa8,Map1b,Map2,Nefl,Nefm,Rtn4,Tubb4a,Ybx1,Ywhae		
GO:0030424	axon	Actb,Calm1,Camk2a,Camk2d,Dynll1,Hspa8,Map1b,Map2, Nefl,Nefm,Rtn4,Tubb4a,Ywhae		
GO:0098794	postsynapse	Actb,Camk2a,Camk2b,Camk2g,Capzb,Hspa8,Map1b,Map2, Nefm,Rtn4,Ywhaz		
GO:0005874	microtubule	Dynll1,Dynll2,Hspa8,Map1b,Map2,Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a,Tubb6		
GO:0045202	synapse	Actb,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g,Capzb,Grn,Hspa8, Map1b,Map2,Nefm,Rtn4,Ywhaz		
GO:0005883	neurofilament	Ina,Nefl,Nefm		
GO:0015630	microtubule cytoskeleton	Calm1,Camk2b,Dynll1,Dynll2,Hspa8,Map1b,Map2,Tuba1a, Tuba1c,Tubb4a,Tubb6,Ywhae		
GO:0030426	growth cone	Calm1,Map1b,Map2,Nefl,Rtn4,Ywhae		
GO:0016529	sarcoplasmic reticulum	Calu,Camk2b,Camk2d,Camk2g		
GO:0030425	dendrite	Atxn10,Camk2a,Camk2b,Capzb,Hspa8,Map1b,Map2,Rtn4, Ybx1		
GO:0150034	distal axon	Calm1,Hspa8,Map1b,Map2,Nefl,Rtn4,Ywhae		
GO:0015629	actin cytoskeleton	Actb,Actc1,Capza2,Capzb,Dynll2,Map2,Myl6		
GO:0005853	eukaryotic translation elongation factor 1 complex	Eef1b2,Eef1d		
GO:0099524	postsynaptic cytosol	Camk2a,Hspa8		
GO:0005882	intermediate filament	Hspa8,Ina,Nefl,Nefm		
GO:0008290	F-actin capping protein complex	Capza2,Capzb		
GO:0044294	dendritic growth cone	Map2,Rtn4		
GO:0043194	axon initial segment	Camk2d,Map2		

Table 2. Cont.

List of the most relevant GOs involved in brain development, neuronal differentiation and synaptic formation. GOs enriched for Biological Process, Molecular Function and Cellular Components in NCAM2 interactome. The table shows the GO term identifier, the term description and the list of proteins detected in the mass spectrometry for each specific GO term.

Regarding Molecular Function, presented in Table 2 and Table S4, NCAM2-related proteins are associated with cytoskeleton functions including structural constituents of cytoskeleton (GO:0005200), cytoskeletal protein binding (GO:0008092), cytoskeletal regulatory protein binding (GO:0005519), scaffold protein binding (GO:0097110) and Actin binding (GO:0003779), as well as with translation processes: translation elongation factor activity (GO:0003746), translation factor activity and RNA binding (GO:0008135GO:0003723).

Furthermore, NCAM2 protein interactors are enriched in 78 significant cellular components, as shown in Table 2 and Table S5. Again, NCAM2 partners are classified as cytoskeleton cellular components, cellular components involved in neuronal morphogenesis and maintenance, and synaptogenesis and synaptic maintenance processes.

2.4.3. Pathways Analysis

The results of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGGS) pathways enrichment analysis (Table 3 and Table S6), and the Reactome pathway enrichment analysis (Table 3 and Table S7) are also displayed. Our data show an enrichment in 71 different pathways, including pathways related to calcium and neurotransmitter receptors, cell cycle regulation and to Rho GTPases (Table 3 and Table S7).

Table 3. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGGS) and The Reactome pathways enriched in NCAM2 interactome.

KEGGs Enrichment			
KEGG	Term Description	Proteins	
mmu04722	Neurotrophin signaling pathway	Calm1,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g,Ywhae	
mmu04720	Long-term potentiation	Calm1,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g	
mmu04012	ErbB signaling pathway	Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g	
mmu04540	Gap junction	Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a,Tubb6	
mmu04020	Calcium signaling pathway	Calm1,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g	
mmu04024	cAMP signaling pathway	Calm1,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g	
mmu04360	Axon guidance	Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g	
Reactome pathways enriched			
Reactome	Term Description	Proteins	
MMU-195258	RHO GTPase Effectors	Actb,Calm1,Dynll1,Dynll2,Myl6,Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a, Tubb6,Ywhae,Ywhag,Ywhaz	
MMU-442729	CREB phosphorylation through the activation of CaMKII	Calm1,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g,Nefl	
MMU-442982	Ras activation upon Ca2+ influx through NMDA receptor	Calm1,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g,Nefl	
MMU-199991	Membrane Trafficking	Actb,Capza2,Capzb,Dynll1,Dynll2,Rab33a,Tuba1a,Tuba1c, Tubb4a,Tubb6,Ywhae,Ywhag,Ywhaz	
MMU-438066	Unblocking of NMDA receptors, glutamate binding and activation	Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g,Nefl	
MMU-5576892	Phase 0-rapid depolarization	Calm1,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g	
MMU-190828	Gap junction trafficking	Actb,Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a,Tubb6	
MMU-190840	Microtubule-dependent trafficking of connexons from Golgi to the plasma membrane	Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a,Tubb6	
MMU-399719	Trafficking of AMPA receptors	Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g	
MMU-5673001	RAF/MAP kinase cascade	Actb,Calm1,Camk2a,Camk2b,Camk2d,Camk2g,Nefl	
MMU-1640170	Cell Cycle	Dynll1,Dynll2,Tuba1a,Tuba1c,Tubb4a,Tubb6,Ywhae, Ywhag,Ywhaz	
MMU-5620912	Anchoring of the basal body to the plasma membrane	Dynll1,Tuba1a,Tubb4a,Ywhae,Ywhag	

List of the most relevant KEGGs and Reactome pathways enriched in NCAM2 interactome. The table presents the KEGGs or the Reactome pathways identifier, the term description and the list of proteins detected in the mass spectrometry for each specific item.

Taken together, our results suggest that NCAM2 plays a significant role in the organization of the cytoskeleton and it is involved in calcium signaling and membrane dynamics. These processes are essential for the proper neuronal morphogenesis, synapse formation and neuronal network maintenance.

3. Discussion

In the present study, we explored the interactome of NCAM2 and revealed a significant role of this protein in the organization and dynamics of the cytoskeleton. The mass spectrometry approach showed that NCAM2 interacts with key cytoskeleton components and with a large number of other intracellular proteins. These observations point to NCAM2 functions as crucial for different cytoskeleton-related functions, including neuronal differentiation and maintenance, and synaptogenesis. In addition, our data suggest that NCAM2 may act as a putative receptor for GRN. Our results reveal that NCAM2 interacts with more than 100 proteins in murine cortical samples at two weeks of postnatal development. Since 56% of the identified proteins with two or more peptides were also detected in different experimental conditions, we believe that the method employed here is robust and the resulting data consistent. Nonetheless, it is important to mention that the extraction protocol used in this assay led to an enrichment of the NCAM2.1 isoform compared with NCAM2.2. This is due to the fact that NCAM2.1 is present in the soluble fractions, while NCAM2.2 is more frequently found in lipid rafts (the insoluble fraction), which makes it more difficult to purify.

The results obtained in this work also contribute to a better characterization of NCAM2 protein functions. As previously described, NCAM2.1 bears a transmembrane domain and an intracellular cue, while NCAM2.2 lacks the transmembrane domain and binds to the membrane by a GPI anchor [21,23]. Those differences are important for the localization and possible functions of the isoforms. Our study suggests that the transmembrane isoform, NCAM2.1, could also be found in lipid rafts. The in silico analysis of the amino acid sequence of NCAM2.1 shows similarities in some cysteine residues with NCAM140. The cysteine residues adjacent to the transmembrane domain in NCAM140 are palmitoylation modification sites and are important for targeting the protein to lipid rafts [41,42,56]. Lipid raft localization is crucial for cellular signaling and for the interactions of cell adhesion molecules with other ligands, which, in turn, activate different pathways [41]. The localization of NCAM2.1 in lipid rafts, suggested by the analysis of the amino acidic sequence, was confirmed by the detection of this isoform in lipid rafts. Moreover, the in silico analysis of the NCAM2.1 sequence shows a high percentage of putative residues that are likely to be phosphorylated, some of them coincident with previously described phospho-sites, which could be relevant to better understand NCAM2 functions [33].

Recent studies have determined the importance of NCAM2 in neuronal polarization, cell morphogenesis and in the formation and maintenance of excitatory glutamatergic synapses [25,27,28]. NCAM2 has been reported to induce local calcium spikes through the activation of Src, and to regulate microtubule stability through the formation of a protein complex with MAP2 and 14-3-3 [25]. Here, we reveal the interaction of NCAM2 with a number of other proteins, including cytoskeleton components and cytoskeleton-associated proteins, kinases, translation factors, growth factors and other intracellular components. Regarding the interactions with the cytoskeleton, our data indicate that NCAM2 interacts with Actin and NEFs. The interactions of NCAM2 with Actin and NF200 were validated using immunoprecipitation. Consistent with these results, a reduction of NCAM2-altered Actin cytoskeleton produced an aberrant growth cone mobility in NCAM2-deficient neurons [25]. NCAM2 also interacts with proteins that modulate cytoskeleton function and dynamics, or motor proteins, including MAP2, MAP1B, CAPZA, CAPZB, DYNLL1 and DYNLL2. These proteins are necessary for processes, such as neuronal survival, growth cone extension, axon elongation, autophagy or synapses maintenance. The bioinformatic analysis confirmed the strong relationship between NCAM2 and the cytoskeleton by showing a significant enrichment in terms and pathways related to cytoskeleton organization and dynamics [57-61].

Alterations in cytoskeleton dynamics are found in some pathologies, such as Autism Spectrum Disorders (ASD) or other neurodevelopmental diseases, including lissencephaly [62–64]. For example, the dynamics of Actin polarization is impaired in cells from ASD patients [62]. Consistent with these observations, genetic analyses showed that deletions and single nucleotide polymorphism in NCAM2 gene are detected in ASD patients. Our results suggest that alterations of NCAM2 may cause destabilization or modification of the cytoskeleton, thereby affecting neurodevelopment.

In this study, we detected several NCAM2-interacting proteins that turn out to be linked to synaptogenesis and synaptic plasticity processes. The most relevant ones are CaMKII, HSPA8, MAP1B, CAPZ and elongation factors, such as EEF1B, EEF1D, EIF3H and EIF3F. NCAM2 is highly expressed in the adult brain and highly localized to synapses [28,65]. We detected a strong interaction of NCAM2 with CaMKII in our proteomic analysis. Previous studies have shown that NCAM2 can activate CaMKII [26]. CaMKII is a well-known regulator of neuronal differentiation, synaptogenesis and synaptic plasticity [66].

We detected an interaction of NCAM2 with HSPA8. HSPA8 is a member of the chaperons' family and participates together with HSC70 in protein folding and degradation. HSC70 accumulates in presynaptic buttons and catalyzes the release of Clathrin from Clathrin-coated synaptic vesicles, an event that is necessary for the synaptic vesicle-recycling pathway [67,68]. Other key cytoskeleton proteins found to interact with NCAM2 are MAP1B and CAPZ. Both have an important role in synaptogenesis and synaptic plasticity [46,69]. CAPZ is a capping protein that stabilizes Actin fibers [70] located in the postsynaptic density [71]. Neuronal activity induces its accumulation in the spines, facilitating the remodeling of these postsynaptic structures [72]. The loss of a subunit from the CAPZ complex led to alterations in dendritic spine formation and to defects in the specification of the presynaptic and postsynaptic structures [73].

14-3-3 proteins are involved in the regulation of Cofilin phosphorylation and the stabilization of Actin filaments. The knock-out of 14-3-3 protein in murine models results in a reduction of the dendritic tree complexity and the number of spines. In addition, animals deficient in 14-3-3 proteins bear behavior problems linked to major susceptibility to develop schizophrenia [74–76].

Another novel finding from our mass spectrometry assay is the interaction of NCAM2 with local protein synthesis components, which is a crucial mechanism for synaptic plasticity and other neuronal functions [77]. We detected different proteins involved in translation, such as EEF1B, EEF1D, EIF3H and EIF3F. Overall, our data suggest that NCAM2 plays a key function in the process of synaptogenesis and in the maintenance of synapses and plasticity in adult stages. Amyloid-beta increases NCAM2 cleavage and reduces its function in synapses, which could explain the synaptic loss observed in early stages of Alzheimer's disease [28].

Finally, GRN has been shown to participate in neurite outgrowth and branching, axon growth and synapses formation and maintenance. Furthermore, mutations in the GRN gene have been linked to frontotemporal dementia [78–84] and it has been proposed as a potential target for the treatment of those dementias. One of the proposed receptors for GRN is Sortilin 1 (SORT1) [85], but the induction of neurite outgrowth is not regulated by this receptor, which indicates that another receptor is involved in the process. Our proteomic results suggest that NCAM2 could act as a GRN receptor during neuronal differentiation.

In summary, the present study provides a detailed view of the interactome of NCAM2, and offers additional information about NCAM2 localization and structure. The observed interactions of NCAM2 with cytoskeleton proteins, growth factors and other intracellular components increase our knowledge about this cell adhesion molecule and contribute to explain its functions during brain development and synaptic plasticity. More analyses and studies will be necessary in order to understand the complexity of the NCAM2 interactome in other developmental periods or brain regions. The present work adds substantially to our understanding of NCAM2 and lays the groundwork for a better characterization of NCAM2 functions in the central nervous system during development and adult stages, as well as the implications of this protein in neuronal diseases.

4. Materials and Methods

All experimental procedures were carried out following the guidelines of the Committee for the Care of Research Animals of the University of Barcelona, in accordance with the directive of the Council of the European Community (2010/63 y 86/609/EEC) on animal experimentation. 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).

4.1. Antibodies

The following commercial primary antibodies were: anti-14-3-3 (1657, SantaCruz, Dallas, TX, USA); anti-Actin (MAB1501, Chemicon International-Fischer Scientific, Waltham, MA, USA); anti-CaMKIIα (M1-048, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA); anti-Caveolin (ab2910, Abcam, Cambridge, UK); anti-Clathrin (610500, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-Flotillin (610820, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-MAP2 (M9942 clone HM-2, Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA); anti-NCAM2 (AF778, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)); anti-NCAM2.1 (EB06991, Everest, Oxfordshire, UK); anti-NF200 (N4142, Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA) and anti-Nogo (11027, Santa Cruz, Dallas, TX, USA).

4.2. Mass Spectrometry Assay

Protein immunoprecipitation and analysis were performed as described [25]. Briefly, hippocampus and cortex regions were dissected and homogenized in an isotonic buffer (Tris 10 mM a pH 7,4, KCl 10 mM, MgCl2 1.5 mM, EGTA 1 mM) with protease inhibitors (Complete, Roche, Basel, Switzerland), using a Polytron. The supernatant with the cytosolic fraction was discarded and the membrane fraction was homogenized in a lysis buffer (Hepes 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 10% glycerol, and 1% Triton X-100) in orbital agitation. Samples were centrifugated at 15,000 rpm for 15 min at $4 \,^{\circ}$ C and the supernatant was selected.

For the mass spectrometry assay, magnetic beads (Dyneabeads Antibody Coupling Kit, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were conjugated with an antibody against NCAM2 (AF778, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or with an antibody against NCAM2.1 (EB06991, Everest, Oxfordshire, UK), according to the manufacturer's instructions. The supernatant containing the membrane fraction previously obtained, was incubated with the conjugated magnetic beads o/n at 4 °C. After washing with the lysis buffer 3 times, proteins were eluted with 30 µL of a Urea buffer (urea 8 M, Tris 50 mM a pH 7.5, DTT 60 mM) during 15 min at room temperature. The samples were processed and analyzed at the Proteomic facility of PCB (Proteomics unit, Parc Cientific de Barcelona, Barcelona, Spain). Samples were digested with trypsin (2 μ g, pH 8, 32.5 °C, o/n). The resulting peptides were separated by nanoUPLC (NanoAcquity, Waters, Milford, MA, USA) and detected with Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The detection was performed with a resolution of 60,000, a ratio 400 m/z and an acquisition of 300– 1800 m/z. Protein lists were obtained with an FDR \leq 0.01%. String 11.0 (Elixir, Hinxton, Cambridgeshire, UK) was used for the bioinformatics analysis. The most abundant detected protein was NCAM2 and it was not included in the list.

4.3. Immunoprecipitation for Western Blotting

The membrane fraction obtained as previously described, was incubated with 2 μ g of the selected antibodies overnight (anti-NCAM2.1, anti-NCAM2, anti-MAP2, anti-14-3-3, anti-NF200, anti-CaMKII α and anti-Actin). To precipitate the proteins, protein G-Sepharose beads (17-0618-01, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) were added and samples were incubated for 2 h in orbital agitation. After washing with the lysis buffer, proteins were eluted with 20 μ L of loading buffer (0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 2.15 M β -mercaptoethanol, 10% SDS, 30% glycerol, and 0.012% bromophenol blue) during 5 min at 95 °C and processed for Western blot. Samples were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (1620112; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Filters were blocked in a 5% dry milk-supplemented 0.1% Tween 20 PBS prior to immunoreaction and immunoblotted with antibodies against 14-3-3 (1:2000), Actin (1:5000), Map2 (1:1000), NCAM2 (1:500)

and NCAM2.1 (1:1000). The membranes were incubated with HRP-labeled secondary antibodies (DAKO, Santa Clara, CA, USA) for 1 h at RT in TBST and developed with the ECL system (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

4.4. Sucrose Gradient for Lipid Raft Isolation

The cortex from CD1 mice were used for lipid raft isolation. Two cortices were homogenized in 3 mL of MES (2-morpholino ethanesulfonic acid)-buffered saline (34 mM, pH 6.5 and 0.15 mM NaCl) plus 1% Triton X-100 supplemented with Complete Protease Inhibitor Cocktail (11697498001; Basel, Switzerland). Sucrose was then added to achieve a final concentration of 40%. A 5–30% linear sucrose gradient was layered on top and centrifuged at 39,000 rpm for 16 h at 4 °C in a Beckman SwTi rotor. A total of 12 fractions, 1 mL each, were collected from the top and analyzed by Western blot, as previously described, using the following antibodies: NCAM2 (1:1000), Caveolin (1:5000), Flotillin (1:3000) and Clathrin (1:5000).

4.5. Bioinformatic Analysis

Genomes and proteomes were downloaded from the National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD, USA), Nation al Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) and UniProt database (Geneva, Switzerland). Proteins identified by two or more peptides obtained with FDR $\leq 0.01\%$ were analyzed with String 11.0 [55]. The bit map was elaborated using basic settings. Network edges represent evidence interactions at medium confidence of the score (0.4). The whole genome of mice was assumed for the statistical background in the functional enrichment (Gene Ontology terms, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways and Reactome pathways). Genomes and proteomes were downloaded from the National Institutes of Health (NIH).

To identify NCAM2.1 phosphorylatable domains, the amino acid sequence of the NCAM2.1 cytoplasmatic domain (UniProtKB-O35136, NCAM2_MOUSE, 719–837 amino acids) was analyzed using ScanSite 4.0 at low stringency [86,87] and DISPHOS (DISorderenhanced PHOSphorylation predictor) [88].

To compare the NCAM2.1 and NCAM140 cytoplasmic domains, amino acid sequences of NCAM2.1 (UniProtKB-O35136, NCAM2_MOUSE, 719–837 amino acids) and NCAM140 (UniProtKB-O35136, NCAM1_MOUSE, 730–810 and 1076–1115 amino acids) were analyzed with BLAST software (NIH) and CSS-Palm software 4.0.

4.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA).

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10 .3390/ijms22147404/s1.

Author Contributions: E.S., L.P., A.P. and A.O.-G. conceived and designed the study. A.P. and A.O.-G. performed most of the experiments and analyzed data. F.U. contributed to the design and performed immunoprecipitation experiments. E.d.O. and M.A.O. contributed to the design and performed the mass spectrometry experiments. M.H.-L. performed sucrose gradient for lipid raft isolation. M.B. contributed in resources and reviewed the different versions of the manuscript. A.P., A.O.-G. and E.S. wrote the manuscript and all authors read and corrected the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the Spanish MINECO (SAF2016-76340R and PID2019-106764RB-C21) and CIBERNED (ISCIII) to E.S., Spanish MECD (FPU14/02156, Excellence Unit María de Maeztu/Institute of Neurosciences to E.S. and L.P., and BES-2017-080570 to A.O.-G.) and a grant from Secretary of Universities and Research of the Department of Economy and Knowledge of the Generalitat de Catalunya to A.P.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona (OB36-21FAR, 4 May 2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank all members of the Soriano lab for experimental help and comments. We thank Alba del Valle Vilchez for excellent technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- 1. Namba, T.; Funahashi, Y.; Nakamuta, S.; Xu, C.; Takano, T.; Kaibuchi, K. Extracellular and intracellular signaling for neuronal polarity. *Physiol. Rev.* 2015, *95*, 995–1024. [CrossRef]
- 2. Takano, T.; Xu, C.; Funahashi, Y.; Namba, T.; Kaibuchi, K. Neuronal polarization. Development 2015, 142, 2088–2093. [CrossRef]
- 3. Zinn, K.; Özkan, E. Neural immunoglobulin superfamily interaction networks. Curr. Opin. Neurobiol. 2017, 45, 99–105. [CrossRef]
- Missaire, M.; Hindges, R. The role of cell adhesion molecules in visual circuit formation: From neurite outgrowth to maps and synaptic specificity. *Dev. Neurobiol.* 2015, 75, 569–583. [CrossRef]
- Sytnyk, V.; Leshchyns'ka, I.; Schachner, M. Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily Regulate Synapse Formation, Maintenance, and Function. *Trends Neurosci.* 2017, 40, 295–308. [CrossRef]
- Gu, Z.; Imai, F.; Kim, I.J.; Fujita, H.; Katayama, K.I.; Mori, K.; Yoshihara, Y.; Yoshida, Y. Expression of the immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in the developing spinal cord and dorsal root ganglion. *PLoS ONE* 2015, *10*. [CrossRef] [PubMed]
- Shapiro, L.; Love, J.; Colman, D.R. Adhesion molecules in the nervous system: Structural insights into function and diversity. Annu. Rev. Neurosci. 2007, 30, 451–474. [CrossRef] [PubMed]
- Leshchyns'ka, I.; Sytnyk, V. Reciprocal interactions between cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily and the cytoskeleton in neurons. Front. Cell Dev. Biol. 2016, 4, 9. [CrossRef]
- 9. Frei, J.A.; Stoeckli, E.T. SynCAMs—From axon guidance to neurodevelopmental disorders. *Mol. Cell. Neurosci.* 2017, *81*, 41–48. [CrossRef]
- Makino, T.; McLysaght, A. Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease. *Proc.* Natl. Acad. Sci. USA 2010, 107, 9270–9274. [CrossRef] [PubMed]
- Pébusque, M.J.; Coulier, F.; Birnbaum, D.; Pontarotti, P. Ancient large-scale genome duplications: Phylogenetic and linkage analyses shed light on chordate genome evolution. *Mol. Biol. Evol.* 1998, 15, 1145–1159. [CrossRef]
- 12. Alenius, M.; Bohm, S. Identification of a novel neural cell adhesion molecule-related gene with a potential role in selective axonal projection. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 26083–26086. [CrossRef]
- Yoshihara, Y.; Kawasaki, M.; Tamada, A.; Fujita, H.; Hayashi, H.; Kagamiyama, H.; Mori, K. OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. J. Neurosci. 1997, 17, 5830–5842. [CrossRef]
- Jørgensen, O.S.; Bock, E. Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. J. Neurochem. 1974, 23, 879–880. [CrossRef]
- 15. Sheng, L.; Leshchyns'Ka, I.; Sytnyk, V. Cell adhesion and intracellular calcium signaling in neurons. *Cell Commun. Signal.* **2013**, 11, 94. [CrossRef] [PubMed]
- 16. Christensen, C.; Berezin, V.; Bock, E. Neural cell adhesion molecule differentially interacts with isoforms of the fibroblast growth factor receptor. *Neuroreport* 2011, 22, 727–732. [CrossRef] [PubMed]
- 17. Ramser, E.M.; Buck, F.; Schachner, M.; Tilling, T. Binding of αII spectrin to 14-3-3β is involved in NCAM-dependent neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.* **2010**, 45, 66–74. [CrossRef]
- Li, J.; Zhang, W.; Yang, H.; Howrigan, D.P.; Wilkinson, B.; Souaiaia, T.; Evgrafov, O.V.; Genovese, G.; Clementel, V.A.; Tudor, J.C.; et al. Spatiotemporal profile of postsynaptic interactomes integrates components of complex brain disorders. *Nat. Neurosci.* 2017, 20, 1150–1161. [CrossRef] [PubMed]
- Visser, J.J.; Cheng, Y.; Perry, S.C.; Chastain, A.B.; Parsa, B.; Masri, S.S.; Ray, T.A.; Kay, J.N.; Wojtowicz, W.M. An extracellular biochemical screen reveals that FLRTs and Unc5s mediate neuronal subtype recognition in the retina. *eLife* 2015, 4. [CrossRef]
- Kleene, R.; Mzoughi, M.; Joshi, G.; Kalus, I.; Bormann, U.; Schulze, C.; Xiao, M.F.; Dityatev, A.; Schachner, M. NCAM-induced neurite outgrowth depends on binding of calmodulin to NCAM and on nuclear import of NCAM and fak fragments. *J. Neurosci.* 2010, 30, 10784–10798. [CrossRef]
- Alenius, M.; Bohm, S. Differential function of RNCAM isoforms in precise target selection of olfactory sensory neurons. Development 2003, 130, 917–927. [CrossRef]
- Von Campenhausen, H.; Yoshihara, Y.; Mori, K. OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. *Neuroreport* 1997, 8, 2607–2612. [CrossRef]
- Kulahin, N.; Walmod, P.S. The neural cell adhesion molecule NCAM2/OCAM/RNCAM, a close relative to NCAM. Adv. Exp. Med. Biol. 2010, 663, 403–420. [CrossRef] [PubMed]

- Winther, M.; Berezin, V.; Walmod, P.S. NCAM2/OCAM/RNCAM: Cell adhesion molecule with a role in neuronal compartmentalization. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2012, 44, 441–446. [CrossRef] [PubMed]
- Parcerisas, A.; Pujadas, L.; Ortega-Gascó, A.; Perelló-Amorós, B.; Viais, R.; Hino, K.; Figueiro-Silva, J.; La Torre, A.; Trullás, R.; Simó, S.; et al. NCAM2 Regulates Dendritic and Axonal Differentiation through the Cytoskeletal Proteins MAP2 and 14-3-3. *Cereb. Cortex* 2020, 30, 3781–3799. [CrossRef] [PubMed]
- Sheng, L.; Leshchyns'Ka, I.; Sytnyk, V. Neural cell adhesion molecule 2 promotes the formation of filopodia and neurite branching by inducing submembrane increases in Ca²⁺ levels. J. Neurosci. 2015, 35, 1739–1752. [CrossRef]
- Sheng, L.; Leshchyns'ka, I.; Sytnyk, V. Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2)-Induced c-Src-Dependent Propagation of Submembrane Ca 2+ Spikes Along Dendrites Inhibits Synapse Maturation. *Cereb. Cortex* 2019, 29, 1439–1459. [CrossRef] [PubMed]
- Leshchyns'Ka, I.; Liew, H.T.; Shepherd, C.; Halliday, G.M.; Stevens, C.H.; Ke, Y.D.; Ittner, L.M.; Sytnyk, V. Aβ-dependent reduction of NCAM2-mediated synaptic adhesion contributes to synapse loss in Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 2015, 6. [CrossRef] [PubMed]
- Scholz, C.; Steinemann, D.; Mälzer, M.; Roy, M.; Arslan-Kirchner, M.; Illig, T.; Schmidtke, J.; Stuhrmann, M. NCAM2 deletion in a boy with macrocephaly and autism: Cause, association or predisposition? *Eur. J. Med. Genet.* 2016, 59, 493–498. [CrossRef]
- Molloy, C.A.; Keddache, M.; Martin, L.J. Evidence for linkage on 21q and 7q in a subset of autism characterized by developmental regression. *Mol. Psychiatry* 2005, 10, 741–746. [CrossRef]
- Hussman, J.P.; Chung, R.H.; Griswold, A.J.; Jaworski, J.M.; Salyakina, D.; Ma, D.; Konidari, I.; Whitehead, P.L.; Vance, J.M.; Martin, E.R.; et al. A noise-reduction GWAS analysis implicates altered regulation of neurite outgrowth and guidance in autism. *Mol. Autism* 2011, 2, 1. [CrossRef]
- 32. Petit, F.; Plessis, G.; Decamp, M.; Cuisset, J.M.; Blyth, M.; Pendlebury, M.; Andrieux, J. 21q21 deletion involving NCAM2: Report of 3 cases with neurodevelopmental disorders. *Eur. J. Med. Genet.* **2015**, *58*, 44–46. [CrossRef]
- Huttlin, E.L.; Jedrychowski, M.P.; Elias, J.E.; Goswami, T.; Rad, R.; Beausoleil, S.A.; Villén, J.; Haas, W.; Sowa, M.E.; Gygi, S.P. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* 2010, 143, 1174–1189. [CrossRef]
- Kunz, S.; Ziegler, U.; Kunz, B.; Sonderegger, P. Intracellular Signaling Is Changed after Clustering of the Neural Cell Adhesion Molecules Axonin-1 and NgCAM during Neurite Fasciculation. J. Cell Biol. 1996, 135, 253–267. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Smith, D. Cdk5 in neuroskeletal dynamics. NeuroSignals 2003, 12, 239–251. [CrossRef] [PubMed]
- Lickert, H.; Bauer, A.; Kemler, R.; Stappert, J. Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/β- catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. J. Biol. Chem. 2000, 275, 5090–5095. [CrossRef] [PubMed]
- Fogh, B.S.; Multhaupt, H.A.B.; Couchman, J.R. Protein Kinase C, Focal Adhesions and the Regulation of Cell Migration. J. Histochem. Cytochem. 2014, 62, 172–184. [CrossRef] [PubMed]
- Kwon, Y.T.; Gupta, A.; Zhou, Y.; Nikolic, M.; Tsai, L.H. Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35-Cdk5 kinase. *Curr. Biol.* 2000, 10, 363–372. [CrossRef]
- Cai, X.; Li, M.; Vrana, J.; Schaller, M.D. Glycogen Synthase Kinase 3- and Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Phosphorylation of Paxillin Regulates Cytoskeletal Rearrangement. *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26, 2857–2868. [CrossRef] [PubMed]
- Delling, M.; Wischmeyer, E.; Dityatev, A.; Sytnyk, V.; Veh, R.W.; Karschin, A.; Schachner, M. The neural cell adhesion molecule regulates cell-surface delivery of G-protein-activated inwardly rectifying potassium channels via lipid rafts. J. Neurosci. 2002, 22, 7154–7164. [CrossRef]
- 41. Niethammer, P.; Delling, M.; Sytnyk, V.; Dityatev, A.; Fukami, K.; Schachner, M. Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 521–532. [CrossRef]
- Kamiguchi, H. The region-specific activities of lipid rafts during axon growth and guidance. J. Neurochem. 2006, 98, 330–335. [CrossRef] [PubMed]
- Hérincs, Z.; Corset, V.; Cahuzac, N.; Furne, C.; Castellani, V.; Hueber, A.O.; Mehlen, P. DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. J. Cell Sci. 2005, 118, 1687–1692. [CrossRef]
- Caldwell, J.E.; Heiss, S.G.; Mermall, V.; Cooper, J.A. Effects of CapZ, an Actin Capping Protein of Muscle, on the Polymerization of Actin. *Biochemistry* 1989, 28, 8506–8514. [CrossRef]
- Wear, M.A.; Yamashita, A.; Kim, K.; Maéda, Y.; Cooper, J.A. How capping protein binds the barbed end of the actin filament. *Curr. Biol.* 2003, 13, 1531–1537. [CrossRef]
- 46. Davis, D.A.; Wilson, M.H.; Giraud, J.; Xie, Z.; Tseng, H.C.; England, C.; Herscovitz, H.; Tsai, L.H.; Delalle, I. Capzb2 interacts with β-tubulin to regulate growth cone morphology and neurite outgrowth. *PLoS Biol.* 2009, 7, e1000208. [CrossRef]
- Sinnar, S.A.; Antoku, S.; Saffin, J.M.; Cooper, J.A.; Halpain, S. Capping protein is essential for cell migration in vivo and for filopodial morphology and dynamics. *Mol. Biol. Cell* 2014, 25, 2152–2160. [CrossRef]
- Yuan, A.; Rao, M.V.; Nixon, R.A. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2017, 9. [CrossRef]
- Rao, M.V.; Campbell, J.; Yuan, A.; Kumar, A.; Gotow, T.; Uchiyama, Y.; Nixon, R.A. The neurofilament middle molecular mass subunit carboxyl-terminal tail domains is essential for the radial growth and cytoskeletal architecture of axons but not for regulating neurofilament transport rate. J. Cell Biol. 2003, 163, 1021–1031. [CrossRef] [PubMed]
- 50. Lin, Y.C.; Redmond, L. Neuronal CaMKII acts as a structural kinase. Commun. Integr. Biol. 2009, 2, 40–41. [CrossRef]
- 51. Wu, G.Y.; Cline, H.T. Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. Science 1998, 279, 222–226. [CrossRef]

- 52. Schwab, M.E. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2010, *11*, 799–811. [CrossRef] [PubMed]
- Coyne, A.N.; Lorenzini, I.; Chou, C.C.; Torvund, M.; Rogers, R.S.; Starr, A.; Zaepfel, B.L.; Levy, J.; Johannesmeyer, J.; Schwartz, J.C.; et al. Post-transcriptional Inhibition of Hsc70-4/HSPA8 Expression Leads to Synaptic Vesicle Cycling Defects in Multiple Models of ALS. *Cell Rep.* 2017, 21, 110–125. [CrossRef]
- Liu, T.; Daniels, C.K.; Cao, S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* 2012, 136, 354–374. [CrossRef] [PubMed]
- Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019, 47, D607–D613. [CrossRef] [PubMed]
- 56. Zhang, L.; Zhang, X. Factors Regulating Neurogenesis in the Adult Dentate Gyrus. Hippocampus Plast. Funct. 2018. [CrossRef]
- 57. Twelvetrees, A.E.E.; Pernigo, S.; Sanger, A.; Guedes-Dias, P.; Schiavo, G.; Steiner, R.A.A.; Dodding, M.P.P.; Holzbaur, E.L.L.F. The Dynamic Localization of Cytoplasmic Dynein in Neurons Is Driven by Kinesin-1. *Neuron* 2016, 90, 1000–1015. [CrossRef]
- Grabham, P.W.; Seale, G.E.; Bennecib, M.; Goldberg, D.J.; Vallee, R.B. Cytoplasmic dynein and LIS1 are required for microtubule advance during growth cone remodeling and fast axonal outgrowth. J. Neurosci. 2007, 27, 5823–5834. [CrossRef]
- Roossien, D.H.; Lamoureux, P.; Miller, K.E. Cytoplasmic dynein pushes the cytoskeletal meshwork forward during axonal elongation. J. Cell Sci. 2014, 127, 3593–3602. [CrossRef]
- Maday, S.; Wallace, K.E.; Holzbaur, E.L.F. Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. J. Cell Biol. 2012, 196, 407–417. [CrossRef]
- Uchida, A.; Alami, N.H.; Brown, A. Tight functional coupling of kinesin-1A and dynein motors in the bidirectional transport of neurofilaments. *Mol. Biol. Cell* 2009, 20, 4997–5006. [CrossRef]
- Griesi-Oliveira, K.; Suzuki, A.M.; Alves, A.Y.; Mafra, A.C.C.N.; Yamamoto, G.L.; Ezquina, S.; Magalhães, Y.T.; Forti, F.L.; Sertie, A.L.; Zachi, E.C.; et al. Actin cytoskeleton dynamics in stem cells from autistic individuals. *Sci. Rep.* 2018, *8*, 11138. [CrossRef]
- Moon, H.M.; Wynshaw-Boris, A. Cytoskeleton in action: Lissencephaly, a neuronal migration disorder. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 2013, 2, 229–245. [CrossRef]
- Robinson, R. Loss of microtubule-to-actin linkage disrupts cortical development. *PLoS Biol.* 2011, 9, e1001175. [CrossRef] [PubMed]
- Ichinohe, N.; Yoshihara, Y.; Hashikawa, T.; Rockland, K.S. Developmental study of dendritic bundles in layer 1 of the rat granular retrosplenial cortex with special reference to a cell adhesion molecule, OCAM. Eur. J. Neurosci. 2003, 18, 1764–1774. [CrossRef]
- 66. Hell, J.W. CaMKII: Claiming center stage in postsynaptic function and organization. Neuron 2014, 81, 249–265. [CrossRef]
- Schlossman, D.M.; Schmid, S.L.; Braell, W.A.; Rothman, J.E. An enzyme that removes clathrin coats: Purification of an uncoating ATPase. J. Cell Biol. 1984, 99, 723–733. [CrossRef] [PubMed]
- Zinsmaier, K.E.; Bronk, P. Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 62, 1–11. [CrossRef]
- Tortosa, E.; Montenegro-Venegas, C.; Benoist, M.; Härtel, S.; González-Billault, C.; Esteban, J.A.; Avila, J. Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. J. Biol. Chem. 2011, 286, 40638–40648. [CrossRef]
- Edwards, M.; Zwolak, A.; Schafer, D.A.; Sept, D.; Dominguez, R.; Cooper, J.A. Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014, 15, 677–689. [CrossRef]
- Yoshimura, Y.; Yamauchi, Y.; Shinkawa, T.; Taoka, M.; Donai, H.; Takahashi, N.; Isobe, T.; Yamauchi, T. Molecular constituents of the postsynaptic density fraction revealed by proteomic analysis using multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Neurochem. 2004, 88, 759–768. [CrossRef]
- Kitanishi, T.; Sakai, J.; Kojima, S.; Saitoh, Y.; Inokuchi, K.; Fukaya, M.; Watanabe, M.; Matsuki, N.; Yamada, M.K. Activitydependent localization in spines of the F-actin capping protein CapZ screened in a rat model of dementia. *Genes Cells* 2010, 15, 737–747. [CrossRef] [PubMed]
- Fan, Y.; Tang, X.; Vitriol, E.; Chen, G.; Zheng, J.Q. Actin capping protein is required for dendritic spine development and synapse formation. J. Neurosci. 2011, 31, 10228–10233. [CrossRef]
- Ikeda, M.; Hikita, T.; Taya, S.; Uraguchi-asaki, J.; Toyo-Oka, K.; Wynshaw-boris, A.; Ujike, H.; Inada, T.; Takao, K.; Miyakawa, T.T.; et al. Identification of YWHAE, a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 2008, *17*, 3212–3222. [CrossRef]
- Wachi, T.; Cornell, B.; Toyo-oka, K. Complete ablation of the 14-3-3epsilon protein results in multiple defects in neuropsychiatric behaviors. *Behav. Brain Res.* 2017, 319, 31–36. [CrossRef] [PubMed]
- Foote, M.; Qiao, H.; Graham, K.; Wu, Y.; Zhou, Y. Inhibition of 14-3-3 Proteins Leads to Schizophrenia-Related Behavioral Phenotypes and Synaptic Defects in Mice. *Biol. Psychiatry* 2015, *78*, 386–395. [CrossRef]
- 77. Cao, Y.; Portela, M.; Janikiewicz, J.; Doig, J.; Abbott, C.M. Characterisation of translation elongation factor eEF1B subunit expression in mammalian cells and tissues and co-localisation with eEF1A2. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114117. [CrossRef]
- Kuang, L.; Hashimoto, K.; Huang, E.J.; Gentry, M.S.; Zhu, H. Frontotemporal dementia non-sense mutation of progranulin rescued by aminoglycosides. *Hum. Mol. Genet.* 2020, 29, 624–634. [CrossRef]

- 79. Galimberti, D.; Fumagalli, G.G.; Fenoglio, C.; Cioffi, S.M.G.; Arighi, A.; Serpente, M.; Borroni, B.; Padovani, A.; Tagliavini, F.; Masellis, M.; et al. Progranulin plasma levels predict the presence of GRN mutations in asymptomatic subjects and do not correlate with brain atrophy: Results from the GENFI study. *Neurobiol. Aging* **2018**, *62*, 245.e9–245.e12. [CrossRef]
- Premi, E.; Gazzina, S.; Bozzali, M.; Archetti, S.; Alberici, A.; Cercignani, M.; Bianchetti, A.; Gasparotti, R.; Turla, M.; Caltagirone, C.; et al. Cognitive Reserve in Granulin-Related Frontotemporal Dementia: From Preclinical to Clinical Stages. *PLoS ONE* 2013, *8*, e74762. [CrossRef]
- Roberson, E.D.; Filiano, A.J.; Martens, L.H.; Young, A.H.; Warmus, B.A.; Zhou, P.; Diaz-Ramirez, G.; Jiao, J.; Zhang, Z.; Huang, E.J.; et al. Dissociation of frontotemporal dementia-related deficits and neuroinflammation in progranulin haploinsufficient mice. *Ann. Intern. Med.* 2013, 158, 5352–5362. [CrossRef]
- Kao, A.W.; McKay, A.; Singh, P.P.; Brunet, A.; Huang, E.J. Progranulin, lysosomal regulation and neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2017, 18, 325–333. [CrossRef] [PubMed]
- 83. Petkau, T.L.; Leavitt, B.R. Progranulin in neurodegenerative disease. Trends Neurosci. 2014, 37, 388–398. [CrossRef] [PubMed]
- Petkau, T.L.; Neal, S.J.; Milnerwood, A.; Mew, A.; Hill, A.M.; Orban, P.; Gregg, J.; Lu, G.; Feldman, H.H.; Mackenzie, I.R.A.; et al. Synaptic dysfunction in progranulin-deficient mice. *Neurobiol. Dis.* 2012, 45, 711–722. [CrossRef]
- Gass, J.; Lee, W.C.; Cook, C.; Finch, N.; Stetler, C.; Jansen-West, K.; Lewis, J.; Link, C.D.; Rademakers, R.; Nykjær, A.; et al. Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of Sortilin. *Mol. Neurodegener.* 2012, 7, 33. [CrossRef] [PubMed]
- van de Kooij, B.; Creixell, P.; van Vlimmeren, A.; Joughin, B.A.; Miller, C.J.; Haider, N.; Simpson, C.D.; Linding, R.; Stambolic, V.; Turk, B.E.; et al. Comprehensive substrate specificity profiling of the human nek kinome reveals unexpected signaling outputs. *eLife* 2019, 8. [CrossRef]
- Obenauer, J.C.; Cantley, L.C.; Yaffe, M.B. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signalling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31, 3635–3641. [CrossRef]
- Iakoucheva, L.M.; Radivojac, P.; Brown, C.J.; O'Connor, T.R.; Sikes, J.G.; Obradovic, Z.; Dunker, A.K. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 1037–1049. [CrossRef] [PubMed]



"La memòria té a veure sempre amb el passat, però potser tant o més amb el present i, en conseqüència amb el futur".

Maria Mercè Marçal

Regulation of young adult neurogenesis and neuronal differentiation by Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2)

Alba Ortega-Gascó ^{1,2,*}, Antoni Parcerisas ^{1,2,3,*}, Keiko Hino⁴, Vicente Herranz-Pérez ^{2,5,6}, Fausto Ulloa ^{1,2}, Alba Elias-Tersa ^{1,2}, Miquel Bosch ³, José Manuel García-Verdugo ^{2,5,} Sergi Simó 4, Lluís Pujadas ^{1,2,7,†} and Eduardo Soriano ^{1,2,†.}

¹ Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunulogia, Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

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

³ Departament de Ciències Bàsiques, Universitat Internacional de Catalunya, 08195 Sant Cugat del Vallès, Espanya.

⁴ Department of Cell Biology and Human Anatomy, University of California, Davis, CA 95616, USA.

⁵ Laboratori de Neurobiologia Comparativa, Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, 46010, València, Espanya.

⁶ Unitat de Medicina Predepartamental, Facultat de Ciències de la Salut, Universitat de Jaume I, 12006, Castelló de la Plana, Espanya.

⁷ Departament de Ciències Experimentals i Metodològiques, Facultat de Ciències de la Salut i el Benestar, Unversitat de Vic-Universitat Central de Catalunya (UVic-UCC), 08500, Vic, Catalunya, Espanya

⁸Tissue Repair and Regeneration Laboratory (TR2Lab), Institut de Recerca i Innovació en Ciències de la Vida i de la Salut a la Catalunya Central (IrisCC), 08500, Vic, Catalunya, Espanya.

⁹ Departament de Biociències, Facultat de Ciències, Tecnologia i Enginyeries; Universitat de Vic – Universitat Central de Catalunya (UVic-UCC), 08500, Vic, Catalumya, Espanya.

* Els autors hi han contribuït equitativament.

RESUM

La neurogènesi adulta persisteix en mamífers en les zones neurogèniques on les noves neurones són incorporades en els circuits preexistents per preservar i millorar els processos d'aprenentatge i memòria. Les Molècules d'Adhesió Cel·lular (CAM; de Cell Adhesion Molecules) són elements estructurals rellevants dels nínxols neurogènics que participen en la transducció de senvals i regulen la supervivência, la divisió i la diferenciació dels progenitors de la glia radial (RGPs; de Radial Glial Progenitors). En aquest estudi analitzem les funcions de la Molècula d'Adhesió Neuronal 2 (NCAM2; de l'anglès Neural Cell Adhesion Molecule 2) en la regulació de les RGPs durant la neurogènesi adulta i la corticogènesi. Hem caracteritzat la presència de NCAM2 en els principals tipus cel·lulars que participen en la neurogènesi en el gir dentat, detectant diferents nivells de NCAM2 a mesura que els RGPs progressen per formar noves neurones. Els resultats mostren que la sobreexpressió de Ncam2 en els ratolins adults joves arresta els progenitors en un estat de RGP, afectant al curs normal dels esdeveniments. A més, canvis en els nivells de Ncam2 durant la corticogènesi resulten en dèficits migratoris transitoris, però no afecten a la supervivência ni proliferació de les RGPs suggerint papers diferencials de NCAM2 en els estadis adult i embrionari. Les nostres dades reforcen la rellevància de les CAMs en el procés neurogènic revelant un paper significant dels nivells de Ncam2 en la regulació de la neurogènesi adulta en l'hipocamp.

Regulation of young adult neurogenesis and neuronal differentiation by Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2)

Alba Ortega-Gascó ^{1,2,*}, Antoni Parcerisas^{1,2,3,,8,9*}, Keiko Hino⁴, Vicente Herranz-Pérez^{2,5,6}, Fausto Ulloa^{1,2}, Alba Elias-Tersa^{1,2}, Miquel Bosch³, José Manuel García-Verdugo^{2,5}, Sergi Simó⁴, Lluís Pujadas^{1,2,7,8,†} and Eduardo Soriano^{1,2,†}.

¹ Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology; Institute of Neurosciences; University of Barcelona (UB), 08028, Barcelona, Spain.

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

³ Department of Basic Sciences, International University of Catalonia (UIC), 08195, Sant Cugat del Vallès, Spain.

⁴ Department of Cell Biology and Human Anatomy, University of California, Davis, CA95616, California, USA.

⁵ Laboratory of Comparative Neurobiology, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, 46010, València, Spain.

⁶ Predepartamental Unit of Medicine, Faculty of Health Sciences, Jaume I University, 12006, Castelló de la Plana, Spain.

⁷ Department of Experimental Sciences and Methodology, Faculty of Heath Sciences and Wellfare, University of Vic - Central University of Catalonia (UVic-UCC), 08500, Vic, Catalonia, Spain.

⁸ Tissue Repair and Regeneration Laboratory (TR2Lab), Institut de Recerca i Innovació en Ciències de la Vida i de la Salut a la Catalunya Central (IRIS-CC), 08500, Vic, Catalonia, Spain.

⁹ Biosciences Department; Faculty of Sciences, Technology and Engineerings; University of Vic - Central University of Catalonia (UVic-UCC), 08500, Vic, Catalonia, Spain.

* AO-G and AP contributed equally.

[†] Correspondence: Professor Eduardo Soriano; Lluís Pujadas.

ABSTRACT

Adult neurogenesis persists in mammals in the neurogenic zones, where newborn neurons are incorporated into pre-existing circuits to preserve and improve learning and memory tasks. Relevant structural elements of the neurogenic niches include the family of cell adhesion molecules (CAMs), which participate in signal transduction and regulate the survival, division, and differentiation of radial glial progenitors (RGPs). Here we analyzed the functions of Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2) in the regulation of RGPs in adult neurogenesis and during corticogenesis. We characterized the presence of NCAM2 across the main cell types of the neurogenic process in the dentate gyrus, revealing different levels of NCAM2 amid the progression of RGPs and the formation of neurons. We showed that Ncam2 overexpression in adult mice arrested progenitors in an RGP-like state, affecting the normal course of young adult neurogenesis. Furthermore, changes in Ncam2 levels during corticogenesis led to transient migratory deficits but did not affect the survival and proliferation of RGPs, suggesting a differential role of NCAM2 in adult and embryonic stages. Our data reinforce the relevance of CAMs in the neurogenic process by revealing a significant role of Ncam2 levels in the regulation of RGPs during young adult neurogenesis in the hippocampus.

Keywords: young adult neurogenesis, cell adhesion molecules, corticogenesis, neuronal migration, radial glial progenitor cells.

INTRODUCTION

In mammals, active neurogenesis is preserved during adulthood by radial glial progenitors (RGPs), which remain in specific niches in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus (DG) (Altman and Das 1965; Gonçalves et al. 2016; Gage 2019; Ghosh 2019; Kumar et al. 2019; Denoth-Lippuner and Jessberger 2021). Adult neurogenesis recapitulates developmental neurogenesis steps including proliferation, neuronal fate specification, migration, differentiation, synaptogenesis, and functional integration into pre-existent circuits. Evidence shows that neurogenesis in the adult brain plays an important role in memory and learning processes (Zhao et al. 2008; Bergmann et al. 2015; Kumar et al. 2019). When activated, the RGPs (type I) produce new neurons through a process involving intermediate progenitors (type II and type III cells or neuroblasts) (Ming and Song 2011; Kempermann et al. 2015; Gage 2019).

RGPs are located in specialized microenvironments, or neurogenic niches, where they are subjected to multiple signaling pathways that control their maintenance, proliferation, and lineage progression (Yao et al. 2016; Zhang & Sheng et al. 2015; Zhang, 2018; Zhao et al. 2008). Cell adhesion molecules (CAMs) have been revealed as essential components of these microenvironments (Bian 2013; Morante-Redolat and Porlan 2019). CAMs not only sustain the structure of the niche but also provide a link between the extracellular and the intracellular compartments of RGPs by participating in signal transduction. Different CAMs such as Cadherins/Protocadherins, VCAM1, L1CAM, and NCAM1 have distinct roles in the neurogenic niches (Angata et al. 2007; Bian 2013; Boldrini et al. 2018; Bonfanti 2006; Dihné et al. 2003; Karpowicz et al. 2009; Marthiens et al. 2010; Morante-Redolat and Porlan 2019; Morizur et al. 2018; Shin et al. 2015). Specifically, it has been described that CAMs could be important regulators of the quiescence/activation balance in progenitor cells (Morante-Redolat and Porlan 2019). Adult RGPs are mostly found in a quiescent state, a mitotic-dormant phase in which cells display low metabolic activity but high sensitivity to signals from their environment (Urbán et al., 2019). The quiescence of RGPs is actively maintained through several mechanisms, and the regulation of the transition from quiescence to activation is crucial to preserve the pool of RGPs throughout life (Urbán and Guillemot 2014; Urbán et al. 2019).

The mammalian Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) family is composed of two members, NCAM1 and NCAM2, sharing a similar structure of 5 immunoglobulin domains and 2 fibronectin type III domains, but presenting different expression patterns, post-transcriptional modifications, and molecular interactions (Pébusque et al. 1998; Makino and McLysaght 2010; Parcerisas et al. 2021). NCAM1 is important for neuronal migration, neurite development, synaptogenesis, and it also regulates embryonic and adult neural stem cells (NSCs) during neurogenesis (Kiselyov et al. 2003; Bonfanti 2006; Angata et al. 2007; Boutin et al. 2009; Francavilla et al. 2009). NCAM2 has two different isoforms: NCAM2.1, a transmembrane protein with a cytoplasmatic domain, and NCAM2.2, which is GPI anchored (Von Campenhausen et al. 1997; Alenius and Bohm 2003). In the central nervous system (CNS), the functions of NCAM2 have been mainly linked to the regulation of axonal and dendritic formation and compartmentalization in in the olfactory system (Alenius and Bohm 2003; Kulahin and Walmod 2010; Parcerisas et al. 2021; Winther et al. 2012). It has also been related to the control of neural polarization, neurite outgrowth, dendrite development, and synapse formation and maintenance in the cortex and hippocampus through a complex panel of interactors (Leshchyns'Ka et al. 2015; Parcerisas et al. 2020; Sheng et al. 2015; Parcerisas et al. 2021). Ncam2 has been associated with different pathologies including Down Syndrome (DS), autism spectrum disorder, and Alzheimer's disease (AD). Regarding neurogenesis, Ncam2 expression has been detected in single-cell RNA sequencing (RNAseq) studies that characterized the genetic profiles of quiescent NSCs (qNSCs) and their immediate progeny (Shin et al. 2015; Morizur et al. 2018). However, the role of NCAM2 in RGP biology during neurogenesis remains unknown.

In the present study, we characterized NCAM2 distribution in the young adult hippocampal neurogenic niche and analyzed its role in the regulation of RGP biology during corticogenesis and in adulthood. To gain further insight into the importance of NCAM2 in the abovementioned processes, we used different biological and genetic approaches including *in vivo* hippocampal injection of virus, *in utero* electroporation, and *in vitro* culture of neural stem cells (NSCs). Together, our results indicate that correct NCAM2 levels are crucial for proper young adult neurogenesis and also have a relevant role during cortical development. Moreover, our data suggest that NCAM2 participates in the fine regulation of quiescency in hippocampal RGPs, an observation that could help explain mechanisms underlying some pathologies linked to NCAM2 such as DS, where there is an increased expression of *Ncam2*.

MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures were carried out following the guidelines of the Committee for the Care of Research Animals of the University of Barcelona, in accordance with the directive of the Council of the European Community (2010/63 and 86/609/EEC) on animal experimentation. 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).

Antibodies

The following commercial primary antibodies used for were immunohistochemistry at the dilution indicated: anti-ChFP (ab167453, Abcam, 1:300); anti-BrdU (ab6326, Abcam; 1:500) anti-DCX (A8L1U, Cell Signaling, 1:500); anti-GFP (A11122, Invitrogen, 1:2000); anti-GFP (AB2307313, Aves Labs; 1:500), anti-GFP (ab13970, Abcam; 1:500), anti-GFAP (Z033401, DAKO, 1:2000); anti-Ki67 (ab15580, Abcam, 1:500); anti-MAP2 (MA1406, Sigma, 1:2000); anti-NCAM2 (AF778, R&D Systems, 1:750); anti-NCAM2.1 (EB06991, Everest, 1:500) anti-Nestin (MAB353, Chemicon, 1:100); anti-NeuN (MAB377, Merck, 1:1000); anti-Sox2 (ab97959, Abcam, 1:500); anti-Sox2 (AF2018, R&D Systems; 1:500) and anti-Tbr2/EOMES (23345, Abcam, 1:100). Alexa Fluor conjugated fluorescent secondary antibodies were from Invitrogen. Biotinylated secondary antibodies were from Vector Labs. Gold conjugated secondary antibodies were from UltraSmall (Electron Microscopy Sciences).

Reagents

B-27 supplement, EGF, glutaMAX, normal horse serum (NHS), normal goat serum (NGS), penicillin/streptomycin and trypsin were from Life Technologies. bFGF was from R&D Systems. DNaseI was from Roche diagnostic. Neurobasal medium was from Thermo Fisher Scientific. 5-Bromo-'deoxyuridine (BrdU, B52002), 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamidine (DAPI), diaminobenzidine (DAB) reagent, Durcupan ACM expoxy resin (Fluka), Eukitt,

glucose, gold chloride, heparin, methylbutane, osmium tetroxide, phosphate buffer, propylene oxide, sodium acetate and TritonX-100 were from Sigma-Aldrich. Calcium chloride, hydroxide peroxide, paraformaldehyde (PFA), sodium thiosulfate and Tris were from PanReact Applichem. Mowiol 4-48 mounting medium and sodium citrate were from Merck. Sucrose was from VWR Chemicals. Ketolar (ketamine hydrochloride 50mg/ml) was Ritcher Pharma and Rompun (2% xylazine-thiazine hydrochloride) from Bayer. O.C.T was from Tissue-Tek. Prolong Gold anti-fade reagent was from Molecular Probes. Streptavidinbiotynilated HRP was from GE Healthcare. For the electron microscopy analysis, aurion R-gent Silver enhancer kit, cold-water fish-skin gelation and glutaraldehyde were from Electron Microscopy Sciences; bovine serum albumin-C was from Aurion.

Plasmids

To generate NCAM2.1 and NCAM2.2 overexpression vectors, the cDNA of *Ncam2.1* and *Ncam2.2* were cloned into pWPI vector (Plasmid #12254, Addgene) within PmeI site to obtain pWPI-Ncam2.1 and pWPI-Ncam2.2 plasmids. The cDNA of *Ncam2.1* was amplified from pCNcam2.1 with the primers 5'-ACCATGAGCCTCCTCCTCCC-3' and 5'-CTGACCAAGGTGCTGAAACT-3'. The cDNA of *Ncam2.2* was amplified from pCNcam2.2 with the primers 5'-ACCATGAGCCTCCTCCTCCCC-3' and 5'-TCTCTGATCAGGGAGTACCA-3'. The pCNcam2.1, and pCNcam2.2 plasmids used were previously reported in Parcerisas et al. 2020. For ShRNA vectors, ShCnt (control vector) and ShNCAM2 (NCAM2-silencing vector), constructs were obtained as described in Parcerisas et al. 2020. All vectors contain GFP as a reporter gene.

Production and intrahippocampal injection of lentivirus

The production and intrahippocampal injection of virus were performed as previously described (Parcerisas et al., 2020; Teixeira et al., 2012). Briefly, viral vectors were produced by transient transfection of HEK293T cells with calcium phosphate. Viral particles were concentrated by ultracentrifugation, resuspended in PBS, and stored at -80°C until use. Control (pWPI), Ncam2.1 or Ncam2.2-

overexpressing (pWPI-Ncam2.1 or pWPI-Ncam2.2) and Ncam2-silencing (ShNCAM2) viruses were used to infect progenitor cells. GFP was used to identify infected cells.

For intrahippocampal injections, male wild type C57 8-week-old mice were intraperitoneally anesthetized with a 1:10 ketamine/xylazine solution (100 μ l/60g) and placed on a heating blanket. They were positioned in a Kopf stereotaxic frame and a midline scalp incision was made. The scalp was retracted reflected with hemostats to expose the skull, and bilateral burr holes were drilled. The coordinates used for the injections (in mm from Bregma and mm depth below the skull) were: anteroposterior -2.0, mediolateral ± 1.6, and dorsoventral -2.2. Viruses were then injected (1.5 μ l of viral stock solution per site) into the left and right DG over 20 min using a 5 μ l Hamilton syringe. The syringe was left in place for an additional 5 min. Mice were housed in groups (2-6 mice per cage) and kept on a 12h light-dark s with access to food and water ad libitum.

Histological staining and electron microscopy

Mice were anaesthetized with a of 10:1 mixture of ketamine/xylazine (200 µl per 60g of weight) and intracardially perfused for 20 min with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS). The brains were then removed, post-fixed overnight with 4% PFA in PBS, cryoprotected with 30% sucrose in PBS, and frozen. 30-µm coronal sections of the brains were obtained with a cryostat, and immunohistofluorescence or immunohistochemistry were performed on free-floating sections. Samples were blocked with PBS containing 10% normal horse serum (NHS), 0.3% TritonX-100 and 0.2% gelatin 2h at room temperature (RT); and incubated overnight at 4°C with PBS containing 5% NHS and the primary antibodies (dilutions indicated in the Antibodies and reagents section). For immunohistofluorescence, a subsequent incubation with PBS containing secondary antibodies was carried out. To counterstain nuclei, tissue and cells were incubated in DAPI (1:1000) and the sections were mounted in Mowiol. Images were acquired with a Spectral Confocal SP2 or SP8 microscope (Leica,

Wetzlar, Germany) or a Carl Zeiss LSM880 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany) with 10x or 60x objectives and 1024x1024 pixels resolution.

For immunohistochemistry, after the incubation with primary antibodies a sequential incubation was carried out with biotinylated secondary antibodies and 5% normal goat serum (NGS) in PBS (2 h at RT) and then with streptavidinbiotinylated HRP complex (1:400) and 5% NGS in PBS (2 h at RT). Bound antibodies were visualized by reaction using DAB and hydrogen peroxide as peroxidase substrates, after which the sections were dehydrated and mounted in Eukitt. Images were acquired at 20x or 63x with an AF6000 microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and Olympus Bx61 microscope (Olympus, Shinjuku City, Tokyo, Japan).

For electron microscopy experiments, brain sections were cryoprotected in 25% sucrose and freeze-thawed $(3\times)$ in methylbutane. The sections were then washed in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4), blocked in 0.3% bovine serum albumin-C (BSA) in PB, and incubated with a primary chicken anti-GFP antibody in blocking solution for 72 h at 4°C. The sections were washed in PB, blocked in PB containing 0.5% BSA and 0.1% cold-water fish-skin gelatin for 1 h at RT, and subsequently incubated with a colloidal gold-conjugated secondary antibody (1:50) goat anti-chicken IgG gold in blocking solution for 24 h at RT. The sections were then washed in PB containing 2% sodium acetate. Silver enhancement was performed following the manufacturer's directions, and the sections were washed again in 2% sodium acetate in PB. To stabilize the silver particles, the samples were immersed in 0.05% gold chloride for 10 min at 4°C, washed in sodium thiosulfate, washed in PB, and then postfixed in 2% glutaraldehyde in PB for 30 min. The sections were incubated in 1% osmium tetroxide and 7% glucose in PB and then washed in deionized water. Subsequently, sections were partially dehydrated in 70% ethanol and incubated in 2% uranyl acetate in 70% ethanol in the dark for 2.5 h at 4°C. Brain slices were further dehydrated in 96% and 100% ethanol followed by propylene oxide and infiltrated overnight in Durcupan ACM epoxy resin. The following day, fresh resin was added, and the samples were cured for 72 h at 70°C. Following resin hardening, 1.5-µm semi-thin sections were selected under light microscopy based on their immunolabeling and detached from the glass slides by repeatedly freezing and thawing in liquid nitrogen. 60–70-nm ultra-thin sections were obtained from selected semi-thin sections. Photomicrographs were obtained using a FEI Tecnai G² Spirit transmission electron microscope (FEI Europe, Eindhoven, Netherlands) using a Morada digital camera (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Germany).

In utero electroporation

In utero microinjection and electroporation were performed at embryonic day (E)14.5 as previously described (Simó et al. 2010; Parcerisas et al. 2020), using timed pregnant CD-1 mice (Charles River Laboratories). Briefly, DNA solutions were mixed in 10 mM Tris (pH 8.0) with 0.01% Fast Green. Needles for injection were pulled from Wiretrol II glass capillaries (Drummond Scientific) and calibrated for 1 µl injections. Forceps-type electrodes (Nepagene) with 5-mm pads were used for electroporation (five 50-ms pulses of 45 V at E14.5). Brains were collected at either E19.5-postnatal day (P)0 or at P5, dissected, and those with successful electroporations were identified by epifluorescence microscopy. GFPpositive brains were fixed in 4% formalin in PBS and cryoprotected with 30% sucrose in PBS overnight at 4°C. Brains were frozen in O.C.T compound before 14-µm-thick brain cross-sections were obtained with cryostat and placed on slides. Sections were antigen-retrieved by immersion of the slides in 0.01 M sodium citrate buffer, pH 6.0 at 95°C for 20 min. Sections were blocked with 10% NGS, 10 mM glycine, and 0.3% Triton X-100 in PBS for 2 h at RT. Primary antibodies (anti-GFP and anti-ChFP) were incubated overnight at 4°C. Slides were washed four times for 10 min in 0.1% Triton X-100 in PBS. Secondary antibodies were added for 2 h at RT, and the slides were washed as before and coverslipped with Prolong Gold anti-fade reagent. Images were obtained with epifluorescent illumination and a 10× objective with Leica760 (Leica, Wetzlar, Germany)and AF6000 microscopes (Leica, Wetzlar, Germany); and with Carl Zeiss LSM880 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany) with 10x objectives and 1024x1024 pixels resolution. Data were collected from the lateral part of the anterior neocortex. For quantification of neurons in bin10, the cortex was divided into bins as follows: the distance from the bottom of the SVZ to the pial surface was measured and divided into 10 equally sized bins. The position of GFP- or ChFP-positive neurons was analyzed in 3-5 sections per embryo. The percentage of GFP- or ChFP-labeled neurons in each bin relative to the total number of GFP- or ChFP-labeled neurons across the 10 bins was then calculated for each section.

Neural stem cell culture

NSCs were derived from 7–8 postnatal day (P7–P8) mice following the modified protocol described by Walker and Kempermann 2014. Briefly, the hippocampus were dissected in PBS and the tissue dissociated with a gentle sweeping motion after trypsin and DNase I treatments. Cells were counted and plated in coverslips treated with poly-D-lysine (10 µg/ml, Sigma) and laminin (5 µg/ml, Sigma). Cells were infected with viruses (pWPI, pWPI-NCAM2.1, pWPI- NCAM2.2) and maintained in Neurobasal medium containing 2% B-27 supplement, 100U/mL penicillin/streptomycin and 1X GlutaMAX, 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF), 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) and 2 µg/mL heparin. After 3 days of infection, cells were incubated with 10 µM BrdU during 4h at 37°C.

For NSCs differentiation, cells were counted, plated in non-adherent plates and grown as neurospheres in Neurobasal medium containing 2% B27 supplement (GIBCO), penicillin/streptomycin (Life technologies) and GlutaMAX (Life technologies), 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL bFGF and 2 µg/mL heparin. Cells were maintained at 37°C with 5% CO2 and subcultured every 2-3 days. After 3 passages, neurospheres were dissociated and plated in adherent coverslips. Cells were infected with viruses (pWPI, pWPI-NCAM2.1, pWPI- NCAM2.2, ShCnt and ShNCAM2) and maintained in Neurobasal medium containing 2% B27 supplement, penicillin/streptomycin and Glutamax, without growth factors, at 37°C and 5% CO2 for 5 days.

Immunocitofluorescence

Cultured cells were fixed in 4% PFA for 15 min at room temperature. For the detection of BrdU, DNA hydrolysis was performed prior to the immunostaining. Samples were sequentially incubated with HCl 1M and 1M borate buffer. Cell cultures were permeabilized with PBS 0.1% Triton X-100 for 5 min, blocked with 10% normal horse serum (NHS) and incubated in 5% serum with anti-GFP and anti-BrdU primary antibodies for 2 h at room temperature. Cells were incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor, Invitrogen) and DAPI and finally mounted (Mowiol, Calbiochem). For the analysis of cell differentiation, samples were incubated with anti-GFP and anti-MAP2 primary antibodies. Images were acquired by epifluorescence (E1000, Nikon and Olympus Bx61, Olympus, DMi8 Leica Thunder) and confocal microscopes (Leica and Carl Zeiss LSM880, Zeiss) microscopy at 20x, 25x and 40x with a resolution of 1024x1024.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 8 software (San Diego, CA, USA). For the characterization of the cells infected with GFP-encoding lentiviruses, we calculate the percentage of GFP/Sox2/GFAP triple positive, GFP/DCX or GFP/NeuN double positive cells. Additionally, we quantified the cells GFP/Sox2/GFAP/Ki67 positive proportion of among the GFP/Sox2/GFAP population. For the GFP/Sox2/GFAP triple positive condition, data was also normalized for a better comparison by considering as 100% the values found for the first time point (3d). To determine differences between groups in the adult neurogenesis characterization experiments, one-way ANOVA was used. Post-hoc comparisons were performed by Tukey's test. Statistical significance between groups in distribution of cells during corticogenesis was assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc comparison test. For the analysis of NSCs in vitro, differences between control and overexpressing conditions were assessed by one-way ANOVA with Post-hoc comparisons performed by Tukey's test. We also used Student's t-test to determine statistical significance between ShCnt and ShNCAM2 groups.

RESULTS

Differential expression pattern of NCAM2 in the DG

Since CAMs are important structural elements of the neurogenic niches, we first characterized the distribution of NCAM2 in the different cell populations of the DG of P45 mice by immunofluorescence. DG RGPs express different markers while undergoing several morphological and electrophysiological changes through the neurogenic process that finally gives rise to mature neurons. We used GFAP/Sox2 (double labeling) or Nestin as markers to identify type I progenitors, while Tbr2 was selected to label type II proliferative progenitors (Kempermann et al., 2015). In addition, we detected type III progenitors (neuroblasts) or immature neurons with antibodies against DCX, and mature neurons with NeuN labeling.

As NCAM2 is a membrane protein, the overall pattern of NCAM2 staining clearly delineated the cell bodies and dendrites of neurons. Confocal microscopy analysis revealed strong NCAM2 signal in GFAP/Sox2-positive cells and in Nestin-positive cells with the typical morphology of type I progenitors (i.e., triangular cell bodies located in the SGZ and a single apical process extending into the molecular layer) (**Fig. 1A-C; Supplementary Fig. 1A-B**). Contrariwise, images suggested lower levels of NCAM2 levels in Tbr2-positive cells, although it is difficult to determine the presence of both NCAM2 and Tbr2 in the same cell due to the different localization of each protein (NCAM2 is a membrane-bound protein while Tbr2 is a nuclear factor) (**Fig. 1D; Supplementary Fig. 1C**). Among the DCX-positive cell population, we found several phenotypes with differences in NCAM2 signal, other cells presented higher levels of the protein (**Supplementary Fig. 2A-3A**). Lastly, mature granule cells that expressed NeuN also presented NCAM2 labeling, as expected (**Supplementary Fig. 2B-3B**).



Figure 1. Distribution of NCAM2 in the hippocampal progenitor cells.

A) Immunohistochemical characterization of NCAM2 distribution in Sox2/GFAPpositive progenitor cells in the mouse hippocampal DG. **B)** NCAM2 immunostaining in Sox2/GFAP-positive progenitor cells in P45 mouse DG. Arrowheads indicate NCAM2/Sox2/GFAP triple positive cells with anti-NCAM2.1 antibody (Everest). **B**) NCAM2 immunostaining in Nestin-positive cells in the SGZ of P45 mouse brain. Arrowheads indicate NCAM2/Nestin-positive cells. **C**) Double immunostaining of NCAM2 and Tbr2 at P45. Arrowheads indicate Tbr2-positive cells that present low NCAM2 signal. ML: molecular layer; GL: granule layer; H: hilus. Scale bar: A) 50 μ m, B, C) 20 μ m.

Therefore, the distribution pattern of NCAM2 in the DG of the hippocampus suggests a differential expression across the neurogenic lineage: while both type I progenitors (RGPs) and mature neurons present noticeable NCAM2 staining, the intermediate type II–III progenitors may have decreased NCAM2 levels.

NCAM2 modulates adult neurogenesis in the hippocampus

To study the potential role of NCAM2 in adult neurogenesis, we modulated the levels of NCAM2 protein in the hippocampal neurogenic region. We stereotaxically injected the DG of 8-week-old mice with GFP-containing Ncam2.1overexpressing (pWPI-NCAM2.1), Ncam2.2-overexpressing (pWPI-NCAM2.2), Ncam2-silencing (ShNCAM2), or control lentiviruses (pWPI or ShCnt), which bear preferential infectivity on progenitor cells and neuroblasts (Consiglio et al. 2004; Jandial et al. 2008). We analyzed the transduced DGs 4 weeks after surgery. Mice injected with control viruses exhibited infected cells with a characteristic morphology of dentate granule cells (i.e., round soma in the granular layer, and apical dendrites ramifying in the molecular layer and covered with dendritic spines) (Fig.2A, top left panel). Similar results were found in mice injected with Ncam2silencing viruses, indicating that the downregulation of Ncam2 does not substantially alter the formation or maturation of adult-born neurons in the DG. (Fig. 2A, top right panel). Conversely, we found that many cells infected with either Ncam2.1- or Ncam2.2-overexpressing viruses did not exhibit the typical morphology of maturing granule cells but an RGP-like phenotype (i.e., triangular cell bodies located in the inner granule layer with a single, short radial process spanning the granule layer and ramifying profusely in the inner molecular layer) (Fig. 2A, bottom panels). Some of the cells infected with the overexpression viruses, however, resembled type II progenitors or neuroblasts (i.e., cells with an irregular soma and short processes oriented tangentially, or with a rounded soma and a short apical dendrite oriented towards the molecular layer) or immature granule cells. Enrichment in cells with a RGP-like phenotype was apparently more prominent upon *Ncam2.2* than *Ncam2.1* overexpression.



Figure 2. *Ncam2* overexpression modulates adult neurogenesis in the hippocampus.

A) Representative images of GFPpositive cells in the DG of mice injected with control, ShNcam2, or Ncam2-overexpressing viruses (Ncam2.1 or Ncam2.2) 4 weeks after injection. Control- and ShNcam2infected cells showed a granule cell morphology, while an RGP-like phenotype was observed in many cells infected with Ncam2.1- or Ncam2.2-overexpressing viruses. B) GFP immunogold electron microscopy images of mice infected with control, Ncam2.1-, or Ncam2.2overexpressing viruses and sacrificed weeks post-surgery. Control 4 condition images show densely GFPlabeled granule cells and RGPs (NSCs). In Ncam2.1- and Ncam2.2overexpressing conditions. the number of labeled granule cells was dramatically decreased. Nevertheless, GFP-labeled RGPs located in the SGZ were still noticeable. ML: molecular layer; GL: granule layer; H: hilus; GC: granule cell; RGP: radial glial progenitor; OE: overexpressing. Scale bar: A) 50 µm, B-D) 2 µm.

To further characterize the phenotype of Ncam2-overexpressing cells, we performed an ultrastructural analysis of the infected cells by GFP immunogold staining and electron microscopy imaging (Fig. 2B). Confirming the above results, most control virus-infected cells at the injection site corresponded to dentate granule cells which were densely arranged in the granule layer (Fig. 2B). These cells showed a typical round soma, most of it occupied by the nucleus, which displayed chromatin aggregates. The cytoplasm comprised a thin space with few long cisternae of endoplasmic reticulum and abundant free ribosomes. Nevertheless, we also observed a few control virus-infected cells in the SGZ that resembled RGPs and type II progenitors and neuroblasts (Fig. 2B). In contrast, Ncam2.1- and Ncam2.2-overexpressing cells were detected mainly in the SGZ (Fig. **2B**). These GFP-labeled cells in the SGZ exhibited a large cell body with a major radial process that penetrated the granule layer and extended thin lateral processes among granule neurons. They presented round or triangular nucleus, irregular contour, and intermediate filaments in their electron-lucent cytoplasm (Fig. 2B). These ultrastructural features are characteristic of RGPs (Seri et al. 2004). On the other hand, type II cells and neuroblasts were also identified among Ncam2.1- and Ncam2.2-overexpressing cells that exhibited a smooth contour, dark and scant cytoplasm, abundant polyribosomes, and a less well-developed endoplasmic reticulum than that of granule cells (Fig. 2B). These results support that Ncam2 overexpression could lead to an arrest of infected cells in an RGP/type II progenitor state.

Cell-autonomous overexpression of Ncam2 retains adult-born DG cells in an RGP-like phenotype

To better understand the sequence of events triggered by the expression of *Ncam2* isoforms, mice injected with control and *Ncam2*-overexpressing viruses were sacrificed at different time points: 3 days, 1 week, 2 weeks, and 4 weeks post-injection (**Fig. 3A**).





A) Schematic representation of the experimental approach in parallel with the adult hippocampal neurogenesis process. Eight-week-old mice were injected in the DG area with control, *Ncam2.1-* or *Ncam2.2-*overexpressing lentiviruses with GFP as a reporter gene, and sacrificed at the indicated time points after surgery. **B)** Exemplary images of the DG at 3 days, 1 week, 2 weeks, and 4 weeks after injection of control or *Ncam2-*overexpressing viruses. Higher-magnification images of representative cells revealed the presence of infected cells with an RGP-like morphology in the animals injected with *Ncam2* overexpressing viruses. ML: molecular layer; GL: granule layer; H: hilus; OE: overexpressing. Scale bar: 50 μm.

Although the infection was not strictly restricted to progenitor cells, as expected, the majority of the infected cells in all the experimental conditions exhibited an RGP morphology at 3 days post-injection (Consiglio et al. 2004; Jandial et al. 2008) (**Fig. 3B, Supplementary Fig. 4**). When analyzing later time points, most cells

infected with control viruses showed a morphology typical of immature granule cells at 1 week post-injection, which progressed towards a more mature morphology by 2- and 4 weeks post-injection. In contrast, the morphology of *Ncam2.1-* or *Ncam2.2-*overexpressing cells remained constant over time, with most of the infected cells exhibiting an RGP-like cell morphology, while others showed intermediate progenitor- or neuroblast-like phenotypes (**Fig. 3B**).

The phenotype of cells infected with the viral vectors was additionally characterized by evaluating the expression of specific cell markers at the different time points analyzed. A GFP/Sox2/GFAP triple immunostaining was used to determine the proportion of RGPs within the pool of infected (GFP-positive) cells (Fig. 4A-B). At 3 days post-injection, most infected cells in all experimental conditions were GFP/Sox2/GFAP-triple positive (Supplementary Fig. 4). When analyzing the progression of GFP/Sox2/GFAP-triple positive progenitors in the control condition, we observed a statistically significant, progressive reduction in the number of progenitors over time (Fig. 4C-D). In contrast, in the animals infected with Ncam2.1- or Ncam2.2-overexpressing viruses, we noticed a much less marked decrease in the proportion of those progenitors over time, thus suggesting an arrest of the cells in the progenitor stage (Fig. 4C-D). We confirmed that most Ncam2.1- and Ncam2.2-overexpressing cells morphologically characterized as neuronal progenitor cells did express the neuronal progenitor markers GFAP and Sox2 at 1 week post-injection (Fig. 4A,C). Additionally, quantifications revealed a maintenance of high proportion of GFP/Sox2/GFAPtriple positive cells at 2 weeks and 4 weeks in both Ncam2.1 and Ncam2.2 overexpression groups, with a more pronounced effect in the case of the Ncam2.2 isoform (Fig. 4B-D).



Figure 4. Immunohistochemical characterization of *Ncam2*-overexpressing progenitor cells.

A) Immunostaining with GFP (marker for infected cells) and the RGP markers GFAP and Sox2 in hippocampal sections of mice sacrificed 1 week after injection of control or *Ncam2.1-* or *Ncam2.2-* overexpressing lentiviruses. **B)** Same immunostaining and lentivirus conditions as in A) in mice sacrificed at 4 weeks post-injection. **C-D)** Time-course quantification of the percentage of GFP//GFAP-positive cells in mice injected with control, *Ncam2.1*-, or *Ncam2.2*-overexpressing viruses at 3 days, 1 week, 2 weeks, and 4 weeks post-injection. N=3–5 animals per group, 5–10 sections per animal, 20–50 cells per animal. Data are presented as mean ± SEM; dots represent mean values for individual animals; ANOVA, Tukey's comparison *post-hoc* test; * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001. Arrowheads label GFP/Sox2/GFAP-positive cells. ML: molecular layer; GL: granule layer; H: hilus; OE: overexpressing; d, day; w, week. Scale bar: A, B) 20 µm.

The analysis of the impact of Ncam2 overexpression in the neurogenesis process was complemented by quantifying the number of DCX-positive cells at 2- and 4 weeks post-injection (**Fig. 5A**). According to the expected progression of neurogenic events, in the control condition we observed a marked reduction in the percentage of DCX-positive cells between weeks 2 and 4 post-injection (**Fig. 5C**). Such decline was not detected when either *Ncam2.1* or *Ncam2.2* were overexpressed, in which case we found a persisting number of DCX-positive cells from 2 to 4 weeks post-injection. Finally, the number of NeuN-positive, mature neurons at 4 weeks post-injection was also analyzed (**Fig. 5B**). In agreement with the results presented above, we found a trend towards reduced percentages of NeuN-positive neurons in the *Ncam2* overexpression conditions at 4 weeks post-injection, which reached statistical significance in the *Ncam2.2* isoform compared to controls (**Fig. 5D**).

This time-course analysis suggests that the observations at 4 weeks post-injection in *Ncam2* overexpression conditions are not attributable to a dedifferentiation of immature neurons into progenitor-like cells, but rather to a temporary arrest of SGZ cells in an RGP-like phenotype that leads to a delay in the formation of new neurons.



Figure 5. Immunohistochemical characterization of *Ncam2*-overexpressing neurons.

A) Immunostaining with GFP (marker for infected cells) and DCX as a marker for neuroblasts (type III progenitors) and immature neurons in DG sections of mice sacrificed 4 weeks after injection of control or Ncam2.1- or Ncam2.2-overexpressing lentiviruses. B) Immunostaining with GFP (marker for infected cells) with NeuN as marker for mature neurons in DG sections of the same mice and conditions as in A). C) Quantification of the percentage of GFP/DCX-positive cells in mice injected with control, Ncam2.1-, or Ncam2.2-overexpressing viruses at 2 weeks and 4 weeks post-injection. N=3-4 animals per group, 5-6 sections per animal (>50 cells per animal in the control and 15-30 cells per animal in the Ncam2-overexpressing conditions). D) Quantification of the percentage of GFP/NeuN-positive cells in animals injected with control, Ncam2.1-, or Ncam2.2overexpressing viruses at 4 weeks post-injection. N=4 animals per group, 5 sections per animal (>50 cells per animal). Data are presented as mean ± SEM; dots represent mean values for individual animals; differences between experimental groups: ANOVA, Tukey's comparison post-hoc test; *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001. Arrowheads indicate DCX- or NeuN-positive, GFP-positive cells; arrows indicate NeuN-negative, GFP-positive cells. GL: granule layer; H: hilus; OE: overexpressing; w, week. Scale bar: A, B) 20 µm.
The overexpression of NCAM2 decreases RGPs proliferation

To determine the proliferative capacity of infected progenitor cells, we evaluated the expression of the Ki67 marker in the GFP/Sox2/GFAP population in samples from animals sacrificed at 3 days and 4 weeks post-injection (**Fig. 6 A, B**). As anticipated, no statistically significant differences were observed in the percentage of Ki67-positive progenitors between control and *Ncam2.1-* or *Ncam2.2*overexpressing groups at 3 days after injection (**Fig. 6C**). However, at 4 weeks after injection, the overexpression of NCAM2 resulted in lower percentages of Ki67+ cells among the GFP/Sox2/GFAP population of progenitor cells (**Fig. 6D**). This reduction was significant when the isoform NCAM2.2 was upregulated (**Fig. 6D**). These findings suggest that the overexpression of NCAM2 has an inhibitory effect on the proliferation of NSC progenitors.

Ncam2 overexpression does not arrest embryonic RGPs in neurogenic areas

Since our results point out to an important role of NCAM2 in the regulation of adult RGPs and because NCAM1 is involved in both adult and embryonic neurogenesis, we next sought to study the potential role of NCAM2 during embryonic cortical development. We performed *in utero* electroporation experiments using isoform-specific overexpressing vectors that contained GFP or ChFP as reporter genes. Embryos were electroporated at E14.5 and brains were analyzed at P0 and P5. In the neocortex, the progression of RGPs into subsequent cell types during the neurogenic process is paralleled by their migration to upper layers. Therefore, to understand whether progenitors were arrested at any point, we evaluated the distribution of electroporated E15-born neurons across cortical layers. Interestingly, at P0, we found a non-significant increase of cells located in neurogenic areas (subventricular zone [VZ] and intermediate zone [IZ]) in cortices electroporated with the two *Neuro2* isoforms alone or in combination (**Fig. 7A**).



Figure 6. Analysis of Ki-67 expression in the GFP/Sox2/GFAP positive cells.

A) Immunostaining with GFP (marker for infected cells), the RGP markers GFAP and Sox2 and the proliferative marker Ki-67 in hippocampal sections of mice sacrificed 3 days after injection of control or *Ncam2.1-* or *Ncam2.2-*overexpressing lentiviruses. B) Percentage of Ki-67/GFP/Sox2/GFAP positive cells among the GFP/Sox2/GFAP

progenitors in mice injected with control, *Ncam2.1-*, or *Ncam2.2*-overexpressing viruses at 3 days post-injection. N=3 animals per group, 5–10 sections per animal, 20–50 cells per animal. **C)** Same immunostaining and lentivirus conditions as in A) in mice sacrificed at 4 weeks post-injection. **D)** Percentage of Ki-67/GFP/Sox2/GFAP positive cells among the GFP/Sox2/GFAP progenitors in mice injected with control, *Ncam2.1-*, or *Ncam2.2-* overexpressing viruses at 4 weeks post-injection. N=3 animals per group, 5–10 sections per animal, 20–50 cells per animal. Data are presented as mean \pm SEM; dots represent mean values for individual animals; ANOVA, Tukey's comparison *post-hoc* test; * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.001. Arrowheads label Ki-67/GFP/Sox2/GFAP-positive cells. ML: molecular layer; GL: granule layer; H: hilus; OE: overexpressing; d, day; w, week. Scale bar: A, B) 20 µm.

In addition, we observed alterations in the migration of neurons when modulating Ncam2 expression (Fig. 7B). Our previous study (Parcerisas et al., 2020) showed that both Ncam2 isoforms are expressed in the developing cortex, and that their expression is necessary for correct neuronal migration, since Ncam2 knock-down leads to neuronal mispositioning. In the present analysis, at P0, most E15-born control neurons were located in the upper portion of the cortical plate and displayed a typical immature pyramidal neuron shape, with a main apical dendrite directed towards the marginal zone (Fig. 7B-7C). In the case of E15-born Ncam2.2-overexpressing neurons, we observed an altered distribution with a significant reduction of neurons in the uppermost portion of the cortical plate (bin 10) compared with the control condition (Fig. 7B-C). E15-born Ncam2.1overexpressing neurons showed a tendency to also be located below bin 10 as compared with control neurons (Fig. 7B-C-). A synergistic effect was found when embryos were electroporated with both isoforms (Ncam2.1+Ncam2.2) simultaneously (Fig. 7B-C). In addition, and in contrast with Ncam2 depletion (Parcerisas et al. 2020), Ncam2 overexpression apparently does not disrupt normal dendritic arborization at P0 (Fig. 7F).

In contrast, at P5, E15-born neurons displayed a similar distribution in control and *Ncam2*-overexpressing conditions, with most neurons being located in the lower part of layers II–III (**Fig. 7D-E**). Overall, we found that *Ncam2.1* and *Ncam2.2* overexpression, alone or in combination, did not result in an arrest of cortical progenitor cells in the VZ at any of the stages analyzed. Our results suggest

that, in contrast to the situation in the adult hippocampus, *Ncam2.1* and *Ncam2.2* overexpression in cortical progenitors leads to transient migratory deficits, but not to their arrest in progenitor-like phenotypes in the VZ.



Figure 7. *Ncam2* overexpression does not arrest embryonic RGPs but affects neuronal migration.

A) Representative images of E15-born GFP-positive electroporated neurons in cortical sections from P0 mice. Neurons were electroporated with control, *Ncam2.1* and *Ncam2.2*-overexpressing vectors or a combination of overexpression vectors for both isoforms (*Ncam2.1+Ncam2.2*). **B)** The distribution of transfected cells across cortical layers at P0 was analyzed by dividing the distance from the SVZ to the pial surface in 10 bins. Data are presented as the ratio of electroporated neurons with somas located in each bin. Overexpression of *Ncam2.2* and simultaneous overexpression of both isoforms (*Ncam2.1+Ncam2.2*) induced a reduced proportion of cells in the uppermost bin. N=5–8 animals electroporated with control or overexpression constructs, 3-4 sections per animal; *** P<0.001; two-way ANOVA with Bonferroni comparison *post-hoc* test. **C)** Representative images of E15-born GFP-positive electroporated neurons in cortical sections from P5 mice. Neurons were electroporated with control or a combination of overexpression vectors for both isoforms (*Ncam2.1+Ncam2.2*). **D)** The distribution of

transfected cells across cortical layers was analyzed at P5 in 10 bins, and data are presented as in A). No differences in neuronal distribution were found between control and NCAM2-overexpressing conditions at P5. N=6 animals electroporated with the constructs, 3-4 sections per animal; two-way ANOVA with Bonferroni comparison *posthoc* test. **D**) Higher magnification of representative images of transfected neurons at P0. Neurons showed normal pyramidal neuronal morphology. CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; MZ, marginal zone; SVZ, subventricular zone; I–VI, cortical layers I– VI; WM, white matter. Scale bars: A, D) 50 µm; E) 10 µm.

Silencing of Ncam2 impairs NSCs proliferation in vitro

The implications of NCAM2 in young adult neurogenesis were further investigated in vitro. We first analyzed the proliferation of NSCs grown as and infected with control, ShNCAM2, Ncam2.1-overexpressing, or Ncam2.2overexpressing viruses (Supplementary Fig. 5). As NCAM2 is a cell adhesion molecule, it is challenging to discern whether the effects on the growth of the neurospheres are due to altered proliferation rates or changes in cell adhesion. To overcome these limitations, we analyzed the proliferation of NSCs in adherent cultures derived from the hippocampus of P6-7 mice. Cells were plated in PDL/laminin coated plates in medium supplemented with EGF and bFGF and infected with viruses containing either control, ShNCAM2, Ncam2.1-overexpressing, or Ncam2.2-overexpressing vectors, all of them co-expressing GFP as a reporter gene. When cells reached confluency, we assessed their proliferative capacity using a BrdU incorporation assay. NSCs were incubated with 10 µm BrdU during 4h at 37°C (Fig. 8 A.1). The analysis of BrdU/GPF positive cells showed an increased percentage of BrdU positive cells when the expression of NCAM2 is downregulated. Those findings suggest that NCAM2 could regulate the proliferation of NSCs in vitro (Fig. 8 B-C).

NCAM2.1 overexpression alters the differentiation process

The above *in vivo* and *in vitro* studies suggest that NCAM2 expression arrests infected progenitors into a RGP phenotype and reduces proliferation. To confirm that NCAM2 may control neuronal differentiation, NSC grown as neurospheres were dissociated and plated in PDL/laminin coated plates after passage 3.



Figure 8. Effect of NCAM2 in the proliferation and differentiation of NSCs *in vitro*. A) Scheme showing the protocol for the obtention of post-natal mouse NSCs from the neurogenic niches. A.1) Progenitor cells were isolated, plated in adherent coverslips and infected with control, *Ncam2*-overexpressing and *Ncam2*-silencing viruses. The proliferation of infected cells was determined by a BrdU incorporation assay. A.2) In parallel, isolated cells were grown as neurospheres and dissociated after 3 passages. Neurospheres were dissociated, plated in adherent coverslips and maintained 5 days in differentiation conditions before fixation. B) Representative images of adherent cultures

infected with ShCnt or ShNCAM2 viruses, after BrdU incubation, immunostained with GFP and BrdU markers. **C)** Quantification of GFP/BrdU positive cells in control or *Ncam2*-silencing conditions. **D)** Representative images of adherent cultures infected with control, *Ncam2.1*- or *Ncam2.2*-overexpressing, ShCnt and ShNCAM2 viruses after 5 days upon differentiation conditions immunostained with MAP2 neuronal marker. **E)** Quantification of GFP/MAP2 positive cells control or *Ncam2*-overexpressing cell cultures. Data presented as mean \pm SEM; one-way ANOVA, Tukey's comparison post-hoc test, P=0.06. **F)** Quantification of GFP/MAP2 positive cells in the control or *Ncam2*-silenced viruses conditions. Data presented as mean \pm SEM; t-Student, P=0.06. Arrowheads label MAP2 positive GFP cells, arrows label MAP2 negative GFP cells. Data presented as mean \pm SEM; t-Student. A) 20 µm.

Cells were infected with control, *Neam2*-overexpressing or *Neam2*-silencing viruses and cultured in adherent conditions for 3 days before removal of the bFGF and EGF growth factors. Cultures were then maintained for 5 additional days to allow cell differentiation (**Fig. 8A.2**). Interestingly, we observed MAP2/GFP positive cells in the *Neam2*-overexpressing conditions (**Fig. 8D**), indicating that NCAM2 does not totally block the differentiation of progenitor cells to neurons. However, quantitative analyses revealed a lower percentage of MAP2/GFP cells in SGZ *Neam2.1*-overexpressing cells, compared to controls (**Fig. 8E**). Although being statistically non-significant, the same tendency is observed when NCAM2.2 is overexpressed in the SGZ. We did not detect differences in the number of MAP2 positive cells when NCAM2 was silenced (**Fig. 8 D-F**).

The in *vitro* data reinforce the *in vivo* evidences suggesting a contribution of NCAM2 in regulation of adult neurogenesis. Together, the data presented here suggest that fine regulation of NCAM2 expression levels is relevant, with overexpression leading to retention of progenitor cells in undifferentiated stages. Transitory depletion of NCAM2 expression could favor proliferation and differentiation of adult progenitors into maturing neurons.

DISCUSSION

The present work provides a deeper understanding on the functions of NCAM2 during embryonic development and adult neurogenesis. Our results suggest that NCAM2 levels regulate the RGP-to-immature neuron transition in the adult DG. In contrast, our data indicate that physiological levels of NCAM2 are not necessary for cortical neurogenesis, but transiently relevant for cortical migration.

Neurogenic niches are crucial for regulating adult RGP properties, as they convey the different physiological stimuli that induce the activation of qRGPs and regulate their division, survival, and differentiation. Recently, CAMs have been revealed as important elements in the cytoarchitecture and signalling of the neurogenic reservoirs (Kokovay et al. 2012; Bian 2013; Porlan et al. 2014; Morizur et al. 2018). In the present study, we characterized the distribution of the NCAM2 molecule in the hippocampal SGZ niche. By immunodetecting NCAM2 in the SGZ populations, we revealed differential levels of NCAM2 among the main actors in the neurogenic process. The observed pattern of NCAM2 suggests high Ncam2 expression in type I progenitors and low levels in intermediate progenitors (Fig. 9). The levels of NCAM2 seem to undergo a progressive increase in the newborn DCX-positive, maturing neurons until reaching high levels in NeuN-positive neurons as NCAM2 becomes necessary to participate in dendrite development, axon formation, and synaptogenesis (Alenius and Bohm 2003; Kulahin and Walmod 2010; Winther et al. 2012; Parcerisas et al. 2020) (Fig. 9). The NCAM2 distribution pattern is supported by previous single-cell RNA data (Shin et al. 2015; Morizur et al. 2018). The genetic profiles of RGPs and their progeny show an enrichment in Ncam2 expression in qRGPs, and a decrease in Ncam2 expression during the activation of RGPs and their transition to intermediate progenitors (Supplementary Fig. 6) (Codega et al. 2014; Shin et al. 2015; Morizur et al. 2018; Xie et al. 2020).



Figure 9. Model of RGP regulation by *Ncam2* expression levels in the hippocampus.

Schematic representation of the proposed model for NSC regulation by *Ncam2* expression. RGPs (type I cells) are GFAP/Sox2/Nestin positive and are maintained in a quiescent state in the SGZ of the DG. Upon activation, RGPs generate Tbr2-positive proliferating intermediate progenitors (type II cells). In turn, these transit-amplifying progenitors produce neuroblasts (type III cells) that express DCX and differentiate into NeuN-positive granule cells. Newborn neurons mature and become functional neurons of the hippocampal circuits through a process regulated by different intrinsic and extrinsic factors, such as growth factors. We postulate that the levels of CAMs such as NCAM2 protein are crucial for the regulation of RGPs quiescence, the activation of their proliferation, and for the proper neuronal differentiation and maturation in later stages (Shin et al. 2015; Morizur et al. 2018; Parcerisas et al. 2020).

Our data show how changes in NCAM2 levels modify the normal course of the neurogenic events. Despite using VSV g pseudotyped lentivirus that preferentially infect progenitor cells for the gene transduction (Consiglio et al., 2004; Jandial et al., 2008), the resulting infection was not strictly restricted to progenitor cells, specially in the control conditions. The different number of cells infected by control and overexpressing viruses could be explained by the increased vector size of the NCAM2 overexpressing plasmids that affect vector production and

transduction efficiency (Canté-Barrett et al., 2016; M et al., 2001; Sweeney & Vink, 2021). For this reason, we analysed differences in percentages and not in total number of infected cells. The majority of the infected cells at the starting point are progenitors in all the conditions and the impact of NCAM2 overexpression on the modulation of adult neurogenesis is clear. Infecting progenitor cells of the hippocampal SGZ with Ncam2-overexpressing lentiviruses seems to arrest these cells in an RGP-like phenotype and delay the formation of new granule cells, as we characterized by morphological, immunohistochemical, and ultrastructural analyses. Nonetheless, inducing Ncam2 depletion in this hippocampal neurogenic zone did not lead to an increase in the number of newly produced neurons. The underlying cause for this inconsistency might lie on technical limitations that hinders from infecting a uniform and comparable number of cells across conditions, hence precluding a quantitative analysis of the total population of newborn neurons. In order to overcome these limitations, we further investigated the effect of NCAM2 in vitro using a BrdU incorpartion assay in NSCs adherent cultures. We observed that Ncam2 downregulation in progenitor cells in vitro significantly increases the proliferation of NSCs. The effects of NCAM2 in the proliferation of NSCs in vitro have been previously observed in progenitor cells that form the spinal cord (Deleyrolle et al. 2015), which supports the data obtained in the present study.

Diverse underlying mechanisms could explain the effects of Ncam2 overexpression in the neurogenic process. The upregulation of NCAM2 levels could affect the survival of the newborn cells, induce the dedifferentiation of developing neurons, or alter the differentiation of the newborn neurons. However, considering the distribution pattern of NCAM2 and the time-course analysis of the events (Codega et al. 2014; Morizur et al. 2018; Xie et al. 2020), we propose that a fine regulation of *Ncam2* expression levels would be necessary for maintaining RGP quiescence and activating their proliferation. Previous data show the relevance of CAMs in the regulation of stem cell quiescence/activation balance (Codega et al. 2014; Porlan et al. 2014; Shin et al. 2015; Morizur et al. 2018; Xie et al. 2020). Our interpretation is that high levels of NCAM2 may partially arrest cells

in a quiescent state, while the downregulation of Ncam2 may allow RGPs to exit quiescence and enter the cell cycle to proliferate and differentiate (Fig. 8). A temporary retention of cells in the progenitor stages would lead to a delay in the cascade of neurogenic events, thus postponing the generation and maturation of granule cells; however, other explanations may also contribute to the phenotype observed (e.g., changes in cell survival or differentiation to other cell types). Further research is needed to understand the molecular mechanisms by which NCAM2 regulates RGP quiescence, cell proliferation, and differentiation in adulthood. However, one hypothesis is that NCAM2 could interact with growth factor receptors such as the epidermal growth factor receptor (EGFR) or the fibroblast growth factor receptor (FGFR). Growth factors are important regulators of the activation and proliferation of qRGPs (Aguirre et al. 2010; Urbán et al. 2019); and it has been described that FGFR and EGFR receptors interact with NCAM2, as well as with others CAMs (L1CAM or NCAM1) (Kulahin et al. 2008; Francavilla et al. 2009; Deleyrolle et al. 2015; Rasmussen et al. 2018). Another possibility is that NCAM2 expression could cause cytoskeletal rearrangements, which are known to influence the neurogenic process (Compagnucci et al. 2016; Parcerisas et al. 2020; Parcerisaset al. 2021).

Interestingly, the effect of *Ncam2* overexpression in the regulation of adult RGPs was not observed in embryonic cortical progenitors. When modulating the expression of *Ncam2* in embryonic RGPs, we did not find a retention of progenitor cells in the VZ but a transiently altered neuronal distribution, suggesting a delay in the migration of progenitors during cortical development. In spite of the embryonic origin of adult RGPs, adult and embryonic progenitors are subject to a distinct regulation (Urbán and Guillemot 2014; Berg et al. 2018; Daniel Berg et al. 2019). While embryonic RGPs have a high proliferative rate, necessary for the rapid growth of neural tissues (Urbán et al. 2019; Urbán 2014), adult RGPs are mostly found in a quiescent state to avoid the exhaustion of the stem cell pool (Urbán et al. 2019). Therefore, the functions of NCAM2 in regulating stem cell quiescence seem to be more critic during adulthood than in development. In

Our previous results also showed that the downregulation of *Ncam2* leads to an alteration of cortical migration, which results in mislocalization of layer II–III-fated neurons and altered morphology (Parcerisas et al. 2020). Neuronal migration is a key process in corticogenesis, the disruption of which is associated to many diseases including autism spectrum disorder and schizophrenia (Hussman et al. 2011; Petit et al. 2015; Scholz et al. 2016). The mechanisms underlying the effects of NCAM2 on neuronal migration are not known. However, an interaction has been described between NCAM2 and microtubule-associated proteins, such as MAP1B, which also participate in the regulation of neuronal migration (González-Billault et al. 2005; Kawauchi and Hoshino 2008; Parcerisas et al. 2020; Parcerisas, Ortega-gascó, et al. 2021).

Relevance of NCAM2-dependent regulation of hippocampal neurogenesis on learning abilities has not been explored so far. Modulation of neurogenesis by running or exposure to enriched environment would be of great interest to be studied in animal models with up- or down-regulation of the gene and will upgrade the interest of NCAM2 as an adult-plasticity modulatory molecule.

In light of all this evidence, NCAM2 could be related to the neurogenic deficits described in some models of pathologies such as AD, schizophrenia, or epilepsy. In particular, the trisomy of chromosome 21, which causes DS, leads to a gene-dosage effect that results in an increased expression of *Ncam2* gene (Kahlem et al. 2004; Palmer et al. 2021). Our data correlate with the neurogenic alterations proposed in DS mouse models that display a reduced proliferation of progenitor cells and a lower number of differentiated neurons (Lorenzi and Reeves 2006; Hewitt et al. 2010; Belichenko and Kleschevnikov 2011; López-Hidalgo et al. 2016). In the present study, we show that the overexpression of *Ncam2* produces an arrest of the cells in an RGP state and a reduction in newly formed neurons, suggesting a correlation with the neurogenic deficits described in DS mouse models. The potential relevance of these results obtained in murine model findings for human diseases remains uncertain due to the ongoing controversy surrounding adult neurogenesis in humans and the technical challenges associated with its

investigation (Paredes et al. 2018; Sorrells et al. 2018, 2021; Gage 2019; Moreno-Jiménez et al. 2019, 2021; Duque et al. 2022).

Neurogenic niches are complex microenvironments where RGPs receive and interact with multiple signals. CAMs are key elements for the transduction of the signals and the regulation of stem cell behaviour. Our work provides evidence for a remarkable function of NCAM2 in the regulation of RGPs during young adult neurogenesis. Furthermore, we reveal the importance of *Ncam2* expression in regulating neuronal migration and differentiation during corticogenesis in the embryonic development. Overall, the present study not only contributes to a better understanding of the implications of NCAM2 during neuronal development and adult plasticity, but also opens new research lines to explore the molecular basis of DS pathogenesis.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

AUTHORS CONTRIBUTION

E.S., L.P., A.P. and A.O-G. conceived and designed the study. A.O-G. and A.P. performed most of the experiments and analyzed data. K.H. and S.S. designed and performed the *in utero* electroporation experiments. V.H-P. and J.M.G-V. designed, conducted and analyzed the electron microscopy experiments. F.U. supervised the characterization of RGPs. A.E-T and M.B participated in some experiments. A.O-G., A.P., V.H.-P., L.P., and E.S. wrote the manuscript. All authors read and revised the manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities to V.H-P. (PCI2018-093062) to E.S and L.P. (PID2019-106764RB-C21/AEI/10.13039/501100011033) and to A.O.-G (BES-2017-080570).; from the Spanish Ministry of health (ISCIII-CIBERNED) and from the Secretariat of Universities and Research of the Department of Economy and Knowledge of the Generalitat de Catalunya to A.P; from the Valencian Council for Innovation, Universities, Science and Digital Society (PROMETEO/2019/075) to J.M.G-V; and from the National Institute of Health (NIH) (R01NS109176) to S.S.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank A. Lladó and S. Tosi (microscopy facility of the IRB-Barcelona) for FIJI macro design and technical assistance in ScanR acquisition; L. Bardia (microscopy facility of the IRB-Barcelona) for support and technical assistance; E. Coll and M. Calvo (microscopy facilities of the University of Barcelona) for technical assistance; M. Pérez (Universitat Internacional de Catalunya) for technical support in viral production; the members of the Department of Cell Biology, Physiology and Immunology (University of Barcelona), in particular J. Correas for cryostat

support and E. Verdaguer for valuable support; and members of the Soriano lab for experimental help and comments.

ABBREVIATIONS

AD	Alzheimer's disease
ANOVA	Analysis of variance
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BrdU	5-Bromo-'deoxyuridine
BSA	Bovine serum albumine
CAM	Cell adhesion molecule
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
Ce	Cerebellum
ChFP	Cherry fluorescent protein
CNS	Central nervous system
СР	Cortical plate
Cx	Cortex
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamidine
DCX	Doublecortin
DIV	Days in vitro
DG	Dentate gyrus
DNA	Deoxyribonucleic acid
DS	Down syndrome
Е	Embryonic day
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor

FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GC	Granule cell
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
GL	Granule layer
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Н	Hilus
Нр	Hippocampus
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
IZ	Intermediate zone
L1CAM	L1 cell adhesion molecule
MAP1B	Microtubule-associated protein 1B
MAP2	Microtubule-associated protein 2
ML	Molecular layer
MZ	Marginal zone
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
NCAM2	Neural cell adhesion molecule 2
NeuN	Neuronal nuclei
NGS	Normal goat serum
NHS	Normal horse serum
NSC	Neural stem cell

b

- P Postnatal day
- PB Phosphate buffer
- PBS Phosphate buffer saline
- PFA Paraformaldehyde
- qNSCs Quiescent neural stem cell
- qRGP Quiescent radial glial progenitor
- RGP Radial glial progenitor
- RNAseq Ribonucleic acid sequencing
- RT Room temperature
- SEM Scanning electron microscope
- SGZ Subgranular zone
- Sox2 Sry-related HMG box transcription factor
- Str Striatum
- SVZ Subventricular zone
- Tbr2 T-box brain protein 2
- TPM Transcripts per million
- VCAM1 Vascular cell adhesion molecule 1
- VZ Ventricular zone
- WM White matter
- I-VI Cortical layers I-VI

REFERENCES

- Aguirre A, Rubio ME, Gallo V. 2010. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. Nature. 467:323–327.
- Alenius M, Bohm S. 2003. Differential function of RNCAM isoforms in precise target selection of olfactory sensory neurons. Development. 130:917–927.
- Altman J, Das GD. 1965. Post-natal origin of microneurones in the rat brain. Nature. 207:953–956.
- Angata K, Huckaby V, Ranscht B, Terskikh A, Marth JD, Fukuda M. 2007. Polysialic Acid-Directed Migration and Differentiation of Neural Precursors Are Essential for Mouse Brain Development. Mol Cell Biol. 27:6659–6668.
- Belichenko P V., Kleschevnikov AM. 2011. Deficiency of Adult Neurogenesis in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. Genet Etiol Down Syndr.
- Berg DA, Bond AM, Ming G, Song H. 2018. Radial glial cells in the adult dentate gyrus: what are they and where do they come from? F1000Research. 7.
- Bergmann O, Spalding KL, Frisén J. 2015. Adult neurogenesis in humans. Cold Spring Harb Perspect Med. 5.
- Bian S. 2013. Cell Adhesion Molecules in Neural Stem Cell and Stem Cell- Based Therapy for Neural Disorders. In: Neural Stem Cells - New Perspectives. InTech.
- Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, Rosoklija GB, Stankov A, Arango V, Dwork AJ, Hen R, Mann JJ. 2018. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. Cell Stem Cell. 22:589-599.e5.
- Bonfanti L. 2006. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. Prog Neurobiol.

- Boutin C, Schmitz B, Cremer H, Diestel S. 2009. NCAM expression induces neurogenesis in vivo. Eur J Neurosci. 30:1209–1218.
- Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, DeLeo AM, Pastrana E, Doetsch F. 2014. Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. Neuron. 82:545–559.
- Compagnucci C, Piemonte F, Sferra A, Piermarini E, Bertini E. 2016. The cytoskeletal arrangements necessary to neurogenesis. Oncotarget. 7:19414.
- Consiglio A, Gritti A, Dolcetta D, Follenzi A, Bordignon C, Gage FH, Vescovi AL, Naldini L. 2004. Robust in vivo gene transfer into adult mammalian neural stem cells by lentiviral vectors. Proc Natl Acad Sci. 101:14835–14840.
- Daniel Berg AA, Su Y, Jimenez-Cyrus D, Ming G-L, Song H, Bond Correspondence AM, Berg DA, Patel A, Huang N, Morizet D, Lee S, Shah R, Rojas Ringeling F, Jain R, Epstein JA, Wu Q-F, Canzar S, Bond AM. 2019. A Common Embryonic Origin of Stem Cells Drives Developmental and Adult Neurogenesis Article A Common Embryonic Origin of Stem Cells Drives Developmental and Adult Neurogenesis. Cell. 177:654–668.
- Deleyrolle L, Sabourin JC, Rothhut B, Fujita H, Guichet PO, Teigell M, Ripoll C, Chauvet N, Perrin F, Mamaeva D, Noda T, Mori K, Yoshihara Y, Hugnot JP. 2015. OCAM regulates embryonic spinal cord stem cell proliferation by modulating ErbB2 receptor. PLoS One. 10:e0122337.
- Denoth-Lippuner A, Jessberger S. 2021. Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. Nat Rev Neurosci. 1–14.
- Dihné M, Bernreuther C, Sibbe M, Paulus W, Schachner M. 2003. A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. J Neurosci. 23:6638–6650.

- Duque A, Arellano JI, Rakic P. 2022. An assessment of the existence of adult neurogenesis in humans and value of its rodent models for neuropsychiatric diseases. Mol Psychiatry. 27:377.
- Francavilla C, Cattaneo P, Berezin V, Bock E, Ami D, De Marco A, Christofori G, Cavallaro U. 2009. The binding of NCAM to FGFR1 induces a specific cellular response mediated by receptor trafficking. J Cell Biol. 187:1101– 1116.
- Gage FH. 2019. Adult neurogenesis in mammals. Science (80-). 364.
- Ghosh HS. 2019. Adult Neurogenesis and the Promise of Adult Neural Stem Cells. J Exp Neurosci.
- Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. 2016. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. Cell. 167: 897-114.
- González-Billault C, Del Río JA, Ureña JM, Jiménez-Mateos EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simó S, Torre A La, Gavin R, Wandosell F, Soriano E, Ávila J. 2005. A role of MAP1B in Reelin-dependent Neuronal Migration. Cereb Cortex. 15:1134–1145.
- Hewitt CA, Ling KH, Merson TD, Simpson KM, Ritchie ME, King SL, Pritchard MA, Smyth GK, Thomas T, Scott HS, Voss AK. 2010. Gene Network Disruptions and Neurogenesis Defects in the Adult Ts1Cje Mouse Model of Down Syndrome. PLoS One. 5:e11561.
- Hussman JP, Chung RH, Griswold AJ, Jaworski JM, Salyakina D, Ma D, Konidari
 I, Whitehead PL, Vance JM, Martin ER, Cuccaro ML, Gilbert JR, Haines JL,
 Pericak-Vance MA. 2011. A noise-reduction GWAS analysis implicates altered regulation of neurite outgrowth and guidance in autism. Mol Autism.
 2.
- Jandial R, Singec I, Ames CP, Snyder EY. 2008. Genetic Modification of Neural Stem Cells. www.moleculartherapy.org vol. 16:450–457.

- Kahlem P, Sultan M, Herwig R, Steinfath M, Balzereit D, Eppens B, Saran NG,
 Pletcher MT, South ST, Stetten G, Lehrach H, Reeves RH, Yaspo ML. 2004.
 Transcript Level Alterations Reflect Gene Dosage Effects Across Multiple
 Tissues in a Mouse Model of Down Syndrome. Genome Res. 14:1258.
- Karpowicz P, Willaime-Morawek S, Balenci L, Deveale B, Inoue T, Van Der Kooy D. 2009. E-Cadherin regulates neural stem cell self-renewal. J Neurosci. 29:3885–3896.
- Kawauchi T, Hoshino M. 2008. Molecular Pathways Regulating Cytoskeletal Organization and Morphological Changes in Migrating Neurons. Dev Neurosci. 30:36–46.
- Kempermann G, Song H, Gage FH. 2015. Neurogenesis in the Adult Hippocampus.
- Kiselyov V V., Skladchikova G, Hinsby AM, Jensen PH, Kulahin N, Soroka V, Pedersen N, Tsetlin V, Poulsen FM, Berezin V, Bock E. 2003. Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. Structure. 11:691–701.
- Kokovay E, Wang Y, Kusek G, Wurster R, Lederman P, Lowry N, Shen Q, Temple S. 2012. VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. Cell Stem Cell. 11:220–230.
- Kulahin N, Li S, Hinsby A, Kiselyov V, Berezin V, Bock E. 2008. Fibronectin type III (FN3) modules of the neuronal cell adhesion molecule L1 interact directly with the fibroblast growth factor (FGF) receptor. Mol Cell Neurosci. 37:528–536.
- Kulahin N, Walmod PS. 2010. The neural cell adhesion molecule NCAM2/OCAM/RNCAM, a close relative to NCAM. Adv Exp Med Biol. 663:403–420.

- Kumar A, Pareek V, Faiq MA, Ghosh SK, Kumari C. 2019. ADULT NEUROGENESIS IN HUMANS: A Review of Basic Concepts, History, Current Research, and Clinical Implications. Innov Clin Neurosci. 16:30.
- Leshchyns'Ka I, Liew H., Shepherd C, Halliday G., Stevens C., Ke YD, Ittner LM, Sytnyk V. 2015. Aβ-dependent reduction of NCAM2-mediated synaptic adhesion contributes to synapse loss in Alzheimer's disease. Nat Commun. 6:8836.
- López-Hidalgo R, Ballestín R, Vega J, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Gilabert-Juan J, Nácher J, Varea E. 2016. Hypocellularity in the murine model for down syndrome Ts65Dn is not affected by adult neurogenesis. Front Neurosci. 10:75.
- Lorenzi HA, Reeves RH. 2006. Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development. Brain Res. 1104:153–159.
- Makino T, McLysaght A. 2010. Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:9270–9274.
- Marthiens V, Kazanis I, Moss L, Long K, Ffrench-Constant C. 2010. Adhesion molecules in the stem cell niche - More than just staying in shape? J Cell Sci.123: 1613-1622.
- Ming G li, Song H. 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. Neuron.70: 687-702.
- Morante-Redolat JM, Porlan E. 2019. Neural stem cell regulation by adhesion molecules within the subependymal niche. Front Cell Dev Biol.7:102.
- Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, Ávila J, Llorens-Martín M. 2019. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. Nat Med 2019 254. 25:554–560.

- Moreno-Jiménez EP, Terreros-Roncal J, Flor-García M, Rábano A, Llorens-Martín M. 2021. Evidences for Adult Hippocampal Neurogenesis in Humans. J Neurosci. 41:2541–2553.
- Morizur L, Chicheportiche A, Gauthier LR, Daynac M, Boussin FD, Mouthon MA. 2018. Distinct Molecular Signatures of Quiescent and Activated Adult Neural Stem Cells Reveal Specific Interactions with Their Microenvironment. Stem Cell Reports. 11:565–577.
- Palmer CR, Liu CS, Romanow WJ, Lee MH, Chun J. 2021. Altered cell and RNA isoform diversity in aging down syndrome brains. Proc Natl Acad Sci U S A. 118: e2114326118. .
- Parcerisas A, Ortega-Gascó A, Pujadas L, Soriano E. 2021. The Hidden Side of NCAM Family: NCAM2, a Key Cytoskeleton Organization Molecule Regulating Multiple Neural Functions. Int J Mol Sci 2021, Vol 22, Page 10021. 22:10021.
- Parcerisas A, Ortega-Gascó A, HernaizLlorens M, Odena MA, Ulloa F, de Oliveira E, Bosch M, Pujadas L, Soriano E. 2021. New partners identified by mass spectrometry assay reveal functions of NCAM2 in neural cytoskeleton organization. Int J Mol Sci. 22.
- Parcerisas A, Pujadas L, Ortega-Gascó A, Perelló-Amorós B, Viais R, Hino K, Figueiro-Silva J, La Torre A, Trullás R, Simó S, Lüders J, Soriano E. 2020. NCAM2 Regulates Dendritic and Axonal Differentiation through the Cytoskeletal Proteins MAP2 and 14-3-3. Cereb Cortex. 30:3781–3799.
- Paredes MF, Sorrells SF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Auguste KI, Chang EF, Gutierrez Martin AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buylla A. 2018. Does Adult Neurogenesis Persist in the HumanHippocampus? Cell Stem Cell. 23:780.

- Pébusque MJ, Coulier F, Birnbaum D, Pontarotti P. 1998. Ancient large-scale genome duplications: Phylogenetic and linkage analyses shed light on chordate genome evolution. Mol Biol Evol. 15:1145–1159.
- Petit F, Plessis G, Decamp M, Cuisset JM, Blyth M, Pendlebury M, Andrieux J. 2015. 21q21 deletion involving NCAM2: Report of 3 cases with neurodevelopmental disorders. Eur J Med Genet. 58:44–46.
- Porlan E, Martí-Prado B, Morante-Redolat JM, Consiglio A, Delgado AC, Kypta R, López-Otín C, Kirstein M, Fariñas I. 2014. MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. Nat Cell Biol 2014 167. 16:629–638.
- Rasmussen KK, Falkesgaard MH, Winther M, Roed NK, Quistgaard CL, Teisen MN, Edslev SM, Petersen DL, Aljubouri A, Christensen C, Thulstrup PW, Lo Leggio L, Teilum K, Walmod PS. 2018. NCAM2 Fibronectin type-III domains form a rigid structure that binds and activates the Fibroblast Growth Factor Receptor. Sci Rep. 8:1–13.
- Scholz C, Steinemann D, Mälzer M, Roy M, Arslan-Kirchner M, Illig T, Schmidtke J, Stuhrmann M. 2016. NCAM2 deletion in a boy with macrocephaly and autism: Cause, association or predisposition? Eur J Med Genet. 59:493–498.
- Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. 2004. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. J Comp Neurol. 478:359–378.
- Sheng L, Leshchyns'Ka I, Sytnyk V. 2015. Neural cell adhesion molecule 2 promotes the formation of filopodia and neurite branching by inducing submembrane increases in Ca2+ levels. J Neurosci. 35:1739–1752.
- Shin J, Berg DA, Zhu Y, Shin JY, Song J, Bonaguidi MA, Enikolopov G, Nauen DW, Christian KM, Ming GL, Song H. 2015. Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. Cell Stem Cell. 17:360–372.

- Simó S, Jossin Y, Cooper JA. 2010. Cullin 5 regulates cortical layering by modulating the speed and duration of Dab1-dependent neuronal migration. J Neurosci. 30:5668–5676.
- Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Auguste KI, Chang EF, Gutierrez AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buylla A. 2018. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. Nat 2018 5557696. 555:377–381.
- Sorrells SF, Paredes MF, Zhang Z, Kang G, Pastor-Alonso O, Biagiotti S, Page CE, Sandova K, Knox A, Connolly A, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Oldham MC, Yang Z, Alvarez-Buylla A. 2021. Positive Controls in Adults and Children Support That Very Few, If Any, New Neurons Are Born in the Adult Human Hippocampus. J Neurosci. 41:2554–2565.
- Teixeira CM, Kron MM, Masachs N, Zhang H, Lagace DC, Martinez A, Reillo I, Duan X, Bosch C, Pujadas L, Brunso L, Song H, Eisch AJ, Borrell V, Howell BW, Parent JM, Soriano E. 2012. Cell-autonomous inactivation of the reelin pathway impairs adult neurogenesis in the hippocampus. J Neurosci. 32:12051–12065.
- Urbán N, Blomfield IM, Guillemot F. 2019. Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest. Neuron. 104: 834-848.
- Urbán N, Guillemot F. 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. Front Cell Neurosci. 0:396.
- Von Campenhausen H, Yoshihara Y, Mori K. 1997. OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. Neuroreport. 8:2607–2612.
- Walker TL, Kempermann G. 2014. One mouse, two cultures: isolation and culture of adult neural stem cells from the two neurogenic zones of individual mice. J Vis Exp. e51225.

- Winther M, Berezin V, Walmod PS. 2012. NCAM2/OCAM/RNCAM: Cell adhesion molecule with a role in neuronal compartmentalization. Int J Biochem Cell Biol.
- Xie XP, Laks DR, Sun D, Poran A, Laughney AM, Wang Z, Sam J, Belenguer G, Fariñas I, Elemento O, Zhou X, Parada LF. 2020. High-resolution mouse subventricular zone stem-cell niche transcriptome reveals features of lineage, anatomy, and aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 117:31448–31458.
- Yao B, Christian KM, He C, Jin P, Ming GL, Song H. 2016. Epigenetic mechanisms in neurogenesis. Nat Rev Neurosci. 17:537-549.
- Zhang L, Zhang X. 2018. Factors Regulating Neurogenesis in the Adult Dentate Gyrus. In: The Hippocampus - Plasticity and Functions. InTech.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. 2008. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. Cell. 132: 645-660.

Supplementary Information

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Neurosphere culture

Neurosphere cultures were derived from 7–8 postnatal day (P7–P8) mice following the modified protocol described by Walker and Kempermann 2014. Briefly, the hippocampus were dissected in PBS. After trypsin and DNase I treatments, the tissue was dissociated with a gentle sweeping motion. Cells were counted and plated in non-adherent 24-well plates in Neurobasal medium containing 2% B-27 supplement, 100U/ml penicillin/streptomycin and 1X GlutaMAX, 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF), 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) and 2 g/mL heparin. Cells were incubated at 37°C with a 5% CO2 atmosphere and subcultured every 2–3 days.

For the analysis of neurosphere growth, SGZ-derived neurospheres were dissociated with trypsin and infected at passage 2 with lentiviruses containing either pWPI, pWPI-NCAM2.1, pWPI-NCAM2.2, ShNCAM2, or ShCnt. Successfully infected, GFP-positive cells were selected by flow cytometry (BD FACSAria Fusion, San Jose, California, USA), plated in non-adherent 24-well plates, and the resulting neurospheres analyzed during 5 consecutive days. High-content image acquisition was performed with an automated wide-field Olympus IX81 microscope (Olympus Life Science Europe, Waltham, MA) and an UPlan FL N 4× objective. ScanR Acquisition Software version 2.3.0.5 was used to automatically image 20 adjacent fields per well (5 × 4 grid) acquiring a z-stacks for each field (8 z-planes with a z-step of 200 nm). A 10% overlap was set to enable automatic image stitching. Neurosphere area was obtained with a set of 3 custommade macros in Fiji to project each z-stack, stitch these projections, and calculate the area of each neurosphere.

The differences between conditions at day 3 were assessed by one-way ANOVA. Post-hoc comparisons were performed by Kruskal-Wallis test. The frequency distribution according to their area was analyze for the different conditions (Control, NCAM2.1 or NCAM2.2-overexpressing and NCAM2-silencing).

Genetic profile representation

The transcriptomic profiles of *Neum2* and representative transcription factors were obtained from the supplementary data published in Shin et al. (Shin et al., 2015) (Table S6. Single-cell gene expression table according to the pseudotime progression). By single-cell RNAseq, Shin et al., 2015 revealed the levels of expression of different genes during the "pseudotime" progression. In the mentioned article, "pseudotime" refers to the continuous progress from a quiescent neural stem cell (qNSC) state to the activation and transition to an intermediate progenitor state. We represented the values of single-cell gene expression levels during "pseudotime" progression using second order polynomial standard curves.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Α



Supplementary Figure 1. NCAM2 signal in the hippocampal progenitor cells.

Immunohistochemical characterization of NCAM2 distribution in hippocampal progenitors using the antibody against both NCAM2 isoforms (R&D Systems, AF778). **A)**

NCAM2 distribution in Sox2/GFAP-positive progenitor cells in P45 mouse DG. Arrowheads indicate NCAM2/Sox2/GFAP triple positive cells. **B**) NCAM2 immunostaining in Nestin-positive cells in the SGZ of P45 mouse brain. Arrowheads indicate NCAM2/Nestin-positive cells. **C**) Double immunostaining of NCAM2 and Tbr2 at P45. Arrowheads indicate Tbr2-positive cells that present low NCAM2 signal. D) Negative control of NCAM2 staining performed without primary antibodies. ML: molecular layer; GL: granule layer; H: hilus. Scale bar: A) 50 µm, B, C) 20 µm.



Supplementary Figure 2. Distribution of NCAM in hippocampal DCX and NeuN positive cells.

A) Negative control of NCAM2 staining in the hippocampus performed without primary antibodies. **B and C)** Immunohistochemical characterization of NCAM2 distribution in DCX-positive (B) and NeuN (C) positive cells in the hippocampus of P45 mice with the antibody against NCAM2.1 (Everest, EB06991). Arrows indicate DCX-positive/NCAM2-negative cells. Arrowheads indicate DCX-positive/NCAM2-positive cells. ML: molecular layer; GL: granule layer; H: hilus. Scale bar: A, B) 20 μm.



Supplementary Figure 3. NCAM2 expression in DCX and NeuN positive cells.

A) Immunohistochemical characterization of NCAM2 distribution in DCX-positive cells in P45 mice hippocampus with the antibody against NCAM2 (R&D Systems, AF778). A.1) Higher magnification showing DCX-positive/NCAM2-negative cells. A.2) Higher magnification showing DCX-positive/NCAM2-positive cells. Arrows indicate DCXpositive/NCAM2-negative cells. Arrowheads indicate DCX-positive/NCAM2-positive

cells . **B)** NCAM2 immunostaining in NeuN-positive cells in the hippocampus of P45 mice with the antibody against NCAM2 (R&D Systems, AF778). The bottom panel shows a higher magnification of the area indicated in the top panel. ML: molecular layer; GL: granule layer; H: hilus. Scale bar: A, B) 20 µm; high-magnification images: 10 µm.

GFP/Sox2/GFAP cell progression



Supplementary Figure 4. Time-course quantification of the percentage of GFP/Sox2/GFAP-positive cells in the DG.

Graph showing non-normalized percentages of GFP/Sox2/GFAP-positive cells in mice injected with control, *Ncam2.1-*, or *Ncam2.2*-overexpressing viruses at 3 days, 1 week, 2 weeks, and 4 weeks post-injection. N=3–5 animals per group, 5–10 sections per animal. Data are presented as mean \pm SEM; dots represent mean values for individual animals (5–10 slices per animal, 20–50 cells per animal); ANOVA, Tukey's comparison *post-boc* test; * P<0.05, ** P<0.01, **** P<0.0001. OE: overexpressing; d, day; w, week.



Supplementary Figure 5. Analysis of NCAM2 effects on the proliferation of NSCs grown as neurospheres.

A) Diagram showing the protocol for the obtention of postnatal mouse neurospheres from the neurogenic niches. Progenitor cells were isolated, grown as neurospheres and infected with control, *Ncam2*-overexpressing, ShCnt or ShNCAM2 viruses. Infected cells were selected by flow cytometry and plated in non-adherent plates. The area of infected neurospheres was analysed by Scan-R microscopy for 5 consecutive days. **B)** Representative images of control, ShNCAM2, or NCAM2 overexpressing neurospheres

after 3 days *in vitro*. **C)** Quantification of the time-course progress for the area of neurospheres for 5 consecutive days after sorting of infected cells. N= 100-300 neurospheres per condition, 2 independent experiment. **D)** Comparison of the area of neurospheres at 3 days *in vitro* in the overexpressing conditions. Graphs represent the mean and median values of the distribution. N= 100-300 neurospheres per condition, 2 independent experiment. **E)** Comparison of the area of neurospheres at 3 days *in vitro* between ShCnt and ShNCAM2 conditions. Graphs represent the mean and median values of the distribution. N= 100-300 neurospheres at 3 days *in vitro* between ShCnt and ShNCAM2 conditions. Graphs represent the mean and median values of the distribution. N= 100-300 neurospheres per condition, 2 independent experiment. **E)** Histograms of control, NCAM2.1 OE, NCAM2.2 OE and ShNCAM2 neurospheres at 3 days after FACS selection. Scale bar: B) 100 μ m.



Supplementary Figure 6. Expression profiles of Ncam2 and representative transcription factors.

Gene expression profile of Ncam2 along the "pseudotime" progression (left) compared to that of representative transcription factors that are downregulated during the activation of qNSCs and their transition to intermediate progenitors (right). Raw data were obtained from Shin et al. (Shin et al., 2015) and represented as second order polynomial standard curves in blue. TPM, Transcripts per million.


"Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental."

Santiago Ramón y Cajal

Unraveling the role of Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2) in synaptic plasticity

Alba Ortega-Gascó^{1,2,*}, Antoni Parcerisas^{1,2,3,*}, Miquel Bosch³, Lluís Pujadas^{1,2,4,5†} and Eduardo Soriano^{1,2,†}.

¹ Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunulogia, Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Espanya.

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

³ Departament de Ciències Bàsiques, Universitat Internacional de Catalunya, 08195 Sant Cugat del Vallès, Espanya.

⁴ Departament de Ciències Experimentals i Metodològiques, Facultat de Ciències de la Salut i el Benestar, Unversitat de Vic-Universitat Central de Catalunya (UVic-UCC), 08500, Vic, Catalunya, Espanya

⁵Tissue Repair and Regeneration Laboratory (TR2Lab), Institut de Recerca i Innovació en Ciències de la Vida i de la Salut a la Catalunya Central (IrisCC), 08500, Vic, Catalunya, Espanya.

* AO-G i AP hi han contribuït equitativament.

RESUM

La memòria i l'aprenentatge són codificats en el Sistema Nerviós Central (SNC; de *Central nervous system*) a través de modificacions persistents dels circuits neuronals. Aquests canvis depenents d'activitat modifiquen la densitat i la dinàmica de les espines dendrítiques, els compartiments postsinàptiques on tenen lloc la majoria de les sinapsis glutamatèrgiques. En aquest estudi, s'investiga el paper de la Molècula d'Adhesió Neuronal 2 (NCAM2; de *Neural Cell Adhesion Molecule 2*) en la regulació de la sinaptogènesi adulta i la plasticitat sinàptica. A través d'una combinació d'aproximacions *in vivo* i *in vitro* s'ha determinat l'impacte de la proteïna NCAM2 en la densitat de les espines dendrítiques. A més, s'han caracteritzat els efectes dels canvis d'expressió de NCAM2 en l'àrea i la motilitat de les espines en cultius organotípics d'hipocamp. Els nostres resultats han revelat que la regulació a la baixa de NCAM2 disminueix dràsticament el nombre

d'espines dendrítiques en el gir dentat d'animals de vuit setmanes infectats amb virus de silenciament de NCAM2. Aquesta reducció també s'observa en cultius de 21 dies *in vitro* de neurones d'hipocamp. Contràriament, no s'observen diferències significatives en la densitat de les espines dendrítiques quan es sobreexpressa la proteïna NCAM2. Paral·lelament, es va determinar com els canvis en l'expressió de NCAM2 alteren l'àrea de les espines de neurones en cultius organotípics d'hipocamp. El silenciament de NCAM2 provoca una constricció de les espine, mentre que la sobreexpressió de la isoforma transmembrana, NCAM2.1, augmenta la seva mida. NCAM2 ha estat relacionada amb diferents patologies que es caracteritzen per alteracions en les espines dendrítiques com són l'autisme, la síndrome de Down, l'esquizofrènia o la malaltia d'Alzheimer. Per tot això, els nostres resultats poden ajudar a comprendre les alteracions sinàptiques que es donen en aquestes patologies i permetre identificar els mecanismes moleculars desencadenats per NCAM2.

Unraveling the role of Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2) in synaptic plasticity

Alba Ortega-Gascó^{1,2,*}, Antoni Parcerisas^{1,2,3,*}, Miquel Bosch³, Lluís Pujadas^{1,2,4,5†} and Eduardo Soriano^{1,2,†}.

¹ Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology; Institute of Neurosciences; University of Barcelona (UB), 08028, Barcelona, Spain.

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

³ Department of Basic Sciences, International University of Catalonia (UIC), 08195, Sant Cugat del Vallès, Spain.

⁴ Tissue Repair and Regeneration Laboratory (TR2Lab), Institut de Recerca i Innovació en Ciències de la Vida i de la Salut a la Catalunya Central (IrisCC), 08500 Vic, Barcelona, Catalonia, Spain.

⁵Department of Experimental Sciences and Methodology, Faculty of Health Sciences and Wellfare, University of Vic - Central University of Catalonia (UVic-UCC), 08500, Vic, Catalonia, Spain.

* AO-G and AP contributed equally.

[†] Correspondence: Professor Eduardo Soriano.

ABSTRACT

Memory and learning are encoded in the Central Nervous System (CNS) through persistent modifications in neuronal circuits. These activity-dependent changes modify the density and dynamics of dendritic spines, the postsynaptic compartments where the majority of glutamatergic synapses take place. In the present study, we investigated the role of the Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2) in the regulation of adult synaptogenesis and synaptic plasticity. We used a combination of in vivo and in vitro experiments to determine the impact of NCAM2 in the density of dendritic spines. Moreover, we analyze the area and motility of spines using organotypic cultures and in vivo confocal imaging. Our results revealed that the downregulation of NCAM2 drastically affects the number of dendritic spines in the dentate gyrus of 8-week old mice infected with Ncam2silencing viruses. This reduction in the density of spines was corroborated in hippocampal neuronal cultures. Conversely, no significant differences in spine density were observed when NCAM2 was overexpressed. In addition, we observed that changes in NCAM2 expression altered the area of dendritic spines from organotypic cultures. While NCAM2 depletion resulted in dendritic spine shrinkage, the overexpression of the transmembrane isoform, NCAM2.1, led to an enlargement of the spines. NCAM2 has been associated with pathologies characterized by dendritic spine dysfunctions such as Autism Spectrum Disorder (ASD), Down syndrome (DS), schizophrenia or Alzheimer's disease (AD). Therefore, our findings provide insights into the synaptic changes associated with these diseases and shed light on the molecular mechanisms triggered by NCAM2.

Keywords: cell adhesion molecules, dendritic spines, hippocampus, synaptic plasticity, synaptogenesis.

INTRODUCTION

Long term plasticity events require the reorganization of presynaptic and postsynaptic compartments (Citri & Malenka, 2007; Kilinc, 2018; Magee & Grienberger, 2020). While presynaptic plasticity is fundamentally based on variations in the release of neurotransmitters, postsynaptic changes involve modifications in dendritic spines (Yang & Calakos, 2013). Dendritic spines are protrusions of the dendritic plasma membrane that serve as primary sites for the majority of excitatory synapses (Runge et al., 2020). The morphology of these structures is highly variable and allows their classification in different subtypes: filopodia, stubby thin and mushroom (Yuste et al., 2004). Changes in the spine density, morphology and dynamics correlate with long term plasticity events. These modifications rely on the reorganization of a highly dynamic network of actin, one of main components of the spine structure. The structural and molecular organization of spines is characterized by a complex and electrodense network of proteins grouped in the postsynaptic density (PSD) (Rochefort & Konnerth, 2012). The PSD accommodates neurotransmitter receptors, ion channels, scaffolding proteins, cytoskeleton or cell adhesion molecules that are necessary for the correct functioning of synapses. Consequently, dendritic spines dysfunction has been linked to several diseases including neurodevelopmental (Forrest et al., 2018; Runge et al., 2020), psychiatric (Forrest et al., 2018) and neurodegenerative disorders (Dorostkar et al., 2015; Herms & Dorostkar, 2016; Reza-Zaldivar et al., 2020). In particular, the shrinkage of dendritic spines and the loss of synapses is correlated with the cognitive decline observed in Alzheimer's disease patients (Dorostkar et al., 2015; Reza-Zaldivar et al., 2020; Subramanian et al., 2020).

Cell Adhesion Molecules (CAMs) play an important role in the architecture of synapses, displaying both homophilic and heterophilic interactions across the synaptic cleft. Recent evidence suggest that CAMs not only contribute to cell adhesion and molecular assembly, but also are relevant for the synaptic signal transduction providing a link between the environment and cytosolic effectors such as the cytoskeleton (Dityatev et al. 2004; Dalva et al. 2007). Proteins of the immunoglobulin superfamily adhesion molecules such as L1CAM1 or NCAM1 have been described as essential regulators of synapse formation and plasticity (Chazeau et al., 2015; Dalva et al., 2007; Sytnyk et al., 2017; Togashi et al., 2009). The NCAM family is composed by two homologous members: NCAM1 and NCAM2. It has been well stablished that NCAM1 contributes to synaptogenesis and plasticity by regulating the stability and composition of dendritic spines (Togashi et al., 2009). However, the functions of NCAM2 remains largely unexplored.

The Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2), also known as OCAM or RNCAM, is codified by the gene Ncam2 located in the chromosome 16 in mice and chromosome 21 in humans. The alternative splicing of the gene produces two different isoforms: NCAM2.1 and NCAM2.2 (Alenius & Bohm, 2003; Von Campenhausen et al., 1997). Both isoforms establish homophilic trans interactions with the extracellular domain composed by five immunoglobulin (Ig1-Ig5) and two fibronectin type III modules (FnIII1-2) (Kulahin et al., 2011; Rasmussen et al., 2018; Yoshihara et al., 1997). While NCAM2.1 isoform has a unique transmembrane domain and a cytoplasmatic cue that mediates the interaction with the cytoskeleton; NCAM2.2 is bound to the membrane by а glycophosphatidylinositol (GPI) anchor (Parcerisas et al., 2021; Winther et al., 2012; Yoshihara et al., 1997). The functions of the protein have been fully characterized in the olfactory bulb where it is important for the formation of the axo-dendritic compartments (Alenius & Bohm, 2003; Kulahin & Walmod, 2010; Winther et al., 2012). In the cortex and the hippocampus, NCAM2 participates in neuronal polarization, neurite outgrow and adult neurogenesis through the interaction with different extracellular and cytosolic partners (Leshchyns'Ka et al. 2015; Sheng et al. 2015; Parcerisas et al. 2020, 2021; Ortega-Gascó et al., unpubished data). Alterations in Ncam2 gene have been related with different neurodevelopmental and neurodegenerative diseases underscoring its functional role in the development and maintenance of the nervous system. Molecular and genetic studies revealed that dysregulation of NCAM2 expression could be involved in some pathologies such as Autism Spectrum Disorders (ASD), Down syndrome (DS) and Alzheimer's disease (AD) (Kimura et al., 2007; Leshchyns'Ka et al., 2015; Molloy et al., 2005; Paoloni-Giacobino et al., 1997; Petit et al., 2015; Scholz et al., 2016; Winther et al., 2012).

The aim of the present study is to further explore the functions of NCAM2 in the regulation of synaptogenesis and adult postsynaptic plasticity mediated by dendritic spines in the hippocampus. To do so, we used a combination of *in vivo* intrahippocampal viral injections, neuronal cultures and organotypic systems to analyze the effects of the overexpression and downregulation of *Ncam2* on the density, morphology and dynamics of dendritic spines. Our results indicate that NCAM2 contributes to synapse formation and stability; and that physiological levels of NCAM2 are necessary for synapse maintenance in the adult nervous system.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experimental procedures were carried out following the guidelines of the Committee for the Care of Research Animals of the University of Barcelona, in accordance with the directive of the Council of the European Community (2010/63 and 86/609/EEC) on animal experimentation. 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).

Antibodies

The following commercial primary antibodies were used for immunohistochemistry and immunocitofluorescence: anti-GFP (4745-1051, BioRad); anti-GFP (A11122, Invitrogen); anti-Synapsin 1/2 (106 004, Synaptic Systems), anti-PSD-95 (MerckMillipore, MAB1598). Alexa Fluor conjugated fluorescent secondary antibodies were from Invitrogen. Biotinylated secondary antibodies were from Vector Labs.

Reagents

B-27 supplement, EGF, GlutaMAX, normal horse serum (NHS), normal goat serum (NGS), penicillin/streptomycin and trypsin were from Life Technologies. DNaseI was from Roche diagnostic. Neurobasal medium was from Thermo Fisher Scientific. 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamidine (DAPI), diaminobenzidine (DAB) reagent, phosphate buffer and TritonX-100 were from Sigma-Aldrich. Calcium chloride, hydroxide peroxide, paraformaldehyde (PFA), sodium thiosulfate and Tris were from PanReact Applichem. Mowiol 4-48 mounting medium and sodium citrate were from Merck. Sucrose was from VWR Chemicals. Ketolar (ketamine hydrochloride 50mg/ml) was from Ritcher Pharma and Rompun (2% xylazine-thiazine hydrochloride) from Bayer. Streptavidin-biotynilated HRP was from GE Healthcare.

DNA constructs

For the obtention of viral vectors, the cDNA of Ncam2.1 was amplified with 5'-ACCATGAGCCTCCTCCTCC-3' and 5'-CTGACCAAGGTGCTGAAACT-3'and cloned into pWPI (Plasmid #12254, Addgene) within PmeI site. The cDNA of Ncam2.2 was amplified with 5'-ACCATGAGCCTCCTCCTCC-3' and 5'-TCTCTGATCAGGGAGTACCA-3' and cloned into pWPI (Plasmid #12254, Addgene) within PmeI site. The target sequence for depletion of both murine NCAM2 isoforms was GAAGGTACAGGGAAATAAA (ShNCAM2), corresponding to nucleotides 1395-1414 and 2142-2161, respectively, of mouse Ncam2 mRNA. The ShNCAM2 5'sequence was CTGCACCTTCTTTTTGGAAAT -3'; and the ShCnt sequence was 5'-GATCCCCGCAGTGCAATATCGGAAACTTCAAGAGAGTTTCCGATAT TGCACTGCITTT -3'. They were cloned into pLVTHM within the MluI and ClaI sites (Plasmid #12247, Addgene).

To obtain NCAM2 overexpressing vectors for the biolistic transduction of organotypic cultures, the cDNA of NCAM2.1 was amplified with 5'-ACTGGAATTCGTGGCAGCGGAAGGTTCTC-3' and 5'-GTGGCT AGAGAAGAAGGT AC-3' from hippocampal mRNA and cloned into pcDNA3.1 backbone vector using PstI/XbaI sites, pCNAM2.1. The cDNA of NCAM2.2 was amplified with 5' ACTGGAATTCGTGGCA GCGGAAGGTTCTC-3' and 5'-ACTGTCTAGAAATTCAGGGGGA AGGCGAAT-3' from pCR4-TOPO (Mouse Ncam2 cDNA, ABIN4003230) and cloned into pCDNA3.1 (Addgene) using EcoRI/XbaI sites, pCNCAM2.2. For the silencing vectors, the target sequences for depletion of both rat NCAM2 isoforms was 5'-AGCTTCCCCGAAGGTGCAGGGAAATAAATTCAAGAGATTTA TTTCCCTGCACCTTCTTTTTGGAAA-3' (ShNCAM2), corresponding to nucleotides 1395-1414 and 2142-2161, respectively, of rat Ncam2 mRNA. The ShCnt sequence was 5'- AGCTTCCCCGCAGTGCAATATCGGAAACTTCA AGAGAGTTTCCGATATTGCACTGCTTTTTTGGAAA- 3'. They were cloned

into pLVTHM within the MluI and ClaI sites (Plasmid #12247, #Addgene). DsRed2 plasmid was used to label transfected neurons.

Viral production

The production of viral vectors used in the *in vivo* and *in vitro* approaches was performed according to previously described protocols (Parcerisas et al., 2020; Teixeira et al., 2012). Briefly, HEK293T cells were transfected with control (pWPI and ShCnt), *Ncam2.1-* or *Ncam2.2-* overexpressing (pWPI-NCAM2.1 or pWPI-NCAM2.2) and *Ncam2-*silencing (ShNCAM2) vectors with calcium phosphate. All the plasmids contain GFP as a reporter gene to identify infected cells. The viral particles were concentrated by ultracentrifugation, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and stored at -80°C until further use.

Intrahippocampal injections

To perform the intrahippocampal injections, C57 wild type male mice at 8 weeks of age were anesthetized with a 1:10 ketamine/xylazine solution (100 μ l/60g) via intraperitoneal injection and placed on a heated blanket. The mice were secured in a Kopf stereotaxic frame and a midline scalp incision was made. After retracting the scalp with hemostats to expose the skull, bilateral burr holes were drilled. The injections were performed at the dentate gyrus (DG) of the mice at the following coordinates (in mm from Bregma and mm depth below the skull): anteroposterior -2.0, mediolateral \pm 1.6, and dorsoventral -2.2. A total of 1.5 μ l of viral stock solution was injected into the left and right DG over a period of 20 minutes using a 5 μ l Hamilton syringe. The syringe was kept in place for an additional 5 minutes. The mice were group-housed (2-6 mice per cage) and maintained on a 12-hour light-dark cycle with ad libitum access to food and water.

Immunofluorescence labelling of mouse tissue

Mice were intracardially perfused with 4% PFA in 0.1 M PBS after anaesthesia with a 10:1 mixture of ketamine/xylazine (200 μ l per 60g of weight). The brains were removed, post-fixed overnight with 4% PFA in PBS, cryoprotected with 30%

sucrose in PBS, and frozen. Free-floating 30-µm coronal sections were obtained using a cryostat and an immunohistochemistry against GFP was performed to detect infected cells with control, *Ncam2* overexpressing or *Ncam2*-silencing viruses. The tissue was blocked with PBS containing 10% NHS, 0.3% Triton X-100, and 0.2% gelatin for 2 hours at room temperature and incubated overnight at 4°C with primary anti-GFP (1:1000) antibodies. A sequential incubation was carried out with biotinylated secondary antibodies (1:200) and 5% NGS in PBS, followed by the application of streptavidin-biotinylated HRP complex (1:400) and 5% NGS in PBS. Bound antibodies were visualized using 0.03% DAB and 0.01% hydrogen peroxide as peroxidase substrates, after which the sections were dehydrated and mounted in Eukitt. Images were acquired at 10x, 20x and 100x using Olympus Bx61 microscope (Olympus, Shinjuku City, Tokyo, Japan).

Analysis of dendritic spines in vivo

Dendritic spines density of granular neurons from animals injected with *Ncam2* modulatory viruses was analysed by a manual counting method. To quantify the density of dendritic spines, dendrites located in the inner and outer molecular layers (IML and OML) of the dentate gyrus were selected. In detail, the density calculations were made from 20 μ m fragments found in the IML at a distance of 35 um from the granule layer and 5 μ m from the main dendritic axis; and a second region of 20 μ m located 15 μ m away the stratum lacunosum.

Neuronal cultures

The hippocampus of E15-E17 CD-1 mouse embryos were dissected in PBS containing 3% glucose. The tissue was dissociated with gentle swiping after trypsin and DNAse treatments. Cells were counted and infected with control, *Ncam2.1*- or *Ncam2.2* overexpressing and *Ncam2*-silencing viruses before seeding onto poly-D-lysine coated dishes at 10⁵ cells/cm². Cells were maintained in Neurobasal medium containing 2% B27, penicillin/streptomycin, GlutaMAX and conditioned media from matured glia culture in a humidified atmosphere with 5% CO2 during 18-21 days.

Immunofluorescence of cultured neurones

For the immunofluorescence staining of hippocampal cultures, cells were fixed with 4% PFA in PBS for 15 min at 4°C. Samples were washed with PBS and permeabilized with PBS 0.1% Triton X-100 for 15 min. After permeabilization, cells were blocked with 10% NHS and primary antibodies against GFP (1:300), NCAM2.1 (1:250) and the synaptic proteins PSD-95 (1:100) and Synapsin (1:100) were applied for 1:30 h at room temperature. Cells were incubated with secondary antibodies (A488, A568, A647 at 1:500) and DAPI (1:500) to counterstain the nuclei. Finally, coverslips were mounted with Mowiol.

Analysis of dendritic spines in hippocampal cultures

Images of the dendritic spines were acquired by confocal microscopy Carl Zeiss LSM880 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany). Stacks of 10 slices were imaged every 0.22 μ m, with a pinhole value of one airy unit (AI) under a 63x objective at a 1584x1584 resolution. The number GFP/PSD-95/Synapsin triple positive spines in segments of 20-30 μ m was quantified by ImageJ (version 1.53t National Institute of Health, USA).

Organotypic cultures

Hippocampal organotypic slices were obtained from postnatal day 6 to 7 rats as previously described (Bosch et al., 2014). Briefly, the hippocampus of the rats were dissected using a solution containing 25 mM KCl, 260 mM NaHCO₃, 10 mM NaH₂PO₄ and 110 mM glucose. Slices of 400 µm were prepared and placed in transwells with medium MEM supplemented with 20% NHS, 27 mM D-glucose, 6mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 30 mM HEPES, 25% ascorbic acid and insulin. Organotypic cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO2 and medium renovation was conducted every 2-3 days. After 7 days in culture, slices were biolistacally transfected with a combination of plasmids: RFP expressing vector (DsRed2) together with control (pcDNA3.1 or ShCnt), *Ncam2.1-* and *Ncam2.2-*overexpressing (pcNCAM2.1 and pcNCAM2.2) or *Ncam2*-silencing (ShNCAM2) vectors in a 3:1 proportion. DsRed2 was used as a reporter gene to localize transfected neurons.

Image acquisition and analysis

Imaging was carried out with a confocal microscopy Leica SP8 (Leica, Wetzlar, Germany) at 63x and a resolution of 1024x1024 with z stack of 0.45 μ m, zoom 2 and pinhole 1.2 AI. Cultures were maintained in artificial cerebrospinal solution (ACSF) with 2 mM CaCl2 and 2 mM MgSO4 during the acquisition. Images of the apical dendrites of CA1 pyramidal neurones were acquired every 2 minutes during a total of 30 minutes to evaluate the spines dynamics. The results were analysed to determine the density, area and motility of dendritic spines. To quantify the density, the number of dendrites were counted at t=2 min using ImageJ software (version 1.46t, National Institutes of Health, USA). The area was evaluated by the selection of the individual spines at t=2 min, the application of a threshold and the measurement of the area with ImageJ. The motility of spines was evaluated with the macro *EstimateDynamicsDiff* designed by Sebástien Tosi (IRB microscope facility, IRB Barcelona) that analysed the relative position of the spine considering the fraction of image occupied by pixels between different time intervals.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 software (San Diego, CA, USA). In all the experimental approaches, statistical differences between control and *Ncam2* silencing groups was assessed by t-Student test. To determine differences between control, *Ncam2.1-* and *Ncam2.2-*overexpressing conditions, one-way ANOVA was performed followed by Tukey's post-hoc comparison test. The number of samples used in every experiment is described in the figure legends.

RESULTS

NCAM2 downregulation reduces the density of dendritic spines in hippocampal cultures

To investigate the effects of Ncam2 expression in the formation and maintenance of dendritic spines, we obtained hippocampal neuronal cultures from mouse embryos of 15-17 embryonic days (E15-E17). Cells were infected with control (pWPI and ShCnt), Ncam2.1 and Ncam2.2-overexpressing (pWPI-NCAM2.1 and pWPI-NCAM2.2) or Ncam2-silencing (ShNCAM2) viruses when plating. We allowed the polarization, differentiation and maturation of cultures during 21 days in vitro (DIV) (Fig. 1A). First, we analyse the expression of NCAM2 in the synapses and assessed the colocalization of the protein with presynaptic (Synapsin) and postsynaptic (PSD-95) markers in control-infected cells (Fig. 1B). The results shown a high level of colocalization between NCAM2 and PSD-95 (Pearson coefficient of 0.65), and between NCAM2 and Synapsin (Pearson coefficient of 0.66), demonstrating the presence of NCAM2 in the synaptic compartments (Fig. 1B). Next, to figure out the implications of an altered expression of NCAM2 in the postsynaptic compartment, we analysed the density of functional dendritic spines in cultures infected with Ncam2 modulatory viruses. We quantified the density of spines that were positive for GFP (as a reporter gene for the infection), Synapsin and PSD-95. In the case of the overexpression, we found no significant differences in the density of dendritic spines between control and NCAM2.1 or NCAM2.2 overexpressing neurons (Fig. 2 C, D). Interestingly, our results reveal a marked decrease in the number of functional dendritic spines in cells where NCAM2 was silenced compared to controls (Fig. 2 E, F).

Α

SYNAPTIC PLASTICITY IN VITRO



Figure 1. *Ncam2*-silencing reduces dendritic spine density in hippocampal neuronal cultures.

A) Scheme showing the protocol for the obtention of hippocampal cultures from mouse embryos (E18). Cells were infected with control (pWPI or ShCnt), *Ncam2.1* or *Ncam2.2*-overexpressing (pWPI-NCAM2.1 and pWPI-NCAM2.2) or *Ncam2*-silencing (ShNCAM2) viruses before plating. Infected cultures were fixed at 21 DIV and the number of dendritic spines was quantified in GFP-positive cells. **B)** High magnification images of dendrites colabelled with antibodies against NCAM2 and the synaptic proteins PSD-95 or Synapsin in control-infected cultures. Arrowheads label spines with colocalization between NCAM2 and PSD-95 or NCAM2 and Synapsin. **C)** Immunostainings of dendrites from neurons

infected with control or *Ncam2*-overexpressing viruses. Arrowheads label GFP/Synapsin/PSD-95 triple positive synapses. **D)** Quantifications of the density of dendritic spines in control or *Ncam2*-overexpressing conditions. **E)** Immunostainings of dendrites from neurons infected with control or *Ncam2*-silencing viruses. Arrowheads label GFP/Synapsin/PSD-95 triple positive synapses. **F)** Quantifications of the density of dendritic spines in control or *Ncam2*-silencing conditions. N= 3 independent experiments, 10-15 neurons per condition. Data are presented as mean \pm SEM; dots represent mean values for individual experiments. t-Student test (*Ncam2*-overexpressing); *P<0.05. One-way ANOVA; with Tukey's comparison post-hoc test (*Ncam2*-overexpressing); P>0.05. Scale bar: 5 um.

In vivo reduction of NCAM2 expression results in a decline in dendritic spine density

We used an *in vivo* model to further investigate the effects of *Ncam2* downregulation observed in hippocampal cultures. We modulate the expression of *Ncam2* in the DG of 8-week old mice. Mice were stereotaxically injected with control (ShCnt) and *Ncam2*-silencing viruses (ShNCAM2) containing GFP as a reporter gene and sacrificed 4 weeks after injection to determine the effects of the downregulation of the gene in the formation of dendritic spines (**Fig. 1A**). The density of spines was quantified in the outer and inner molecular layers (OML and IML) of the DG, which receives inputs from the entorhinal cortex and the commissural/associational pathways. The results showed a significant decrease in the density of dendritic spines in the OML (reduction of 30%) in neurons where NCAM2 was downregulated compare to controls (**Fig. 1 B, D**). When analysing the dendrites located in the IML, the same tendency was observed although not reaching significance (**Fig. 1. B, C**). Together with the *in vitro* experiments, these results suggest relevant functions of the protein in the regulation of dendritic spines dynamics.



Figure 2. NCAM2 silencing decreases dendritic spine density in the dentate gyrus. A) Schematic representation of the experimental approach. The DG of 8-week-old mice was injected with control (ShCnt) or *Ncam2*-silencing (ShNCAM2) viruses with GFP as a reporter gene, and the samples analyzed 4 weeks after injection. B) Representative images of the DG at 10x and 20x (left and middle panels) and 100x magnifications of IML and OML dendrites (right panels). C) Quantifications of the density of dendritic spines in OML and IML dendrites of mice infected with control or *Ncam2*-silencing viruses. N=3 animals per group, 5-10 sections per animal, 5 dendrites per section. Data are presented as mean \pm SEM; dots represent mean values for individual experiments. t-Student test; ** P<0.01. Arrowheads label dendritic spines. Scale bar: dentate gyrus and suprapyramidal layer 100 μ , IML and OML 20 μ m. GL: granule layer; H: hilus; IML: inner molecular layer; ML: molecular layer, OML: outer molecular layer.

NCAM2 levels control the size of dendritic spines in organotypic cultures

To visualize the remodelling of dendritic spines in situ and the possible alterations in their motility caused by changes in the levels of NCAM2, we prepared organotypic cultures from the hippocampus of P6-P7 rats. The hippocampal slices were biolistically transfected with a combination of plasmids including DsRed2 (as a reporter gene) together with control (pcDNA3.1 or ShNcam2), Ncam2 overexpressing (pcNCAM2.1 or pcNCAM2.2) or Ncam2 silencing (ShNCAM2) vectors in a proportion of 3:1. Images from the CA1 of the transfected neurons, 5-7 days after transfection, were acquired at real time in intervals of 2 min for a total of 30 min (Fig. 3A). During acquisition, cultures were maintained in ACSF solution with in 2mM CaCl₂ and 2mM MgSO₄ reproducing the physiological conditions. First, we quantified the density of spines in the organotypic cultures at the initial time point (t=2 min) to determine if more temporally restricted changes in the expression of Ncam2 affected the number of spines in postnatal cultures. We observed disparate tendencies, a higher density of spines in Ncam2.1overexpressing neurons and a lower density in ShNCAM2 transfected neurons, that did not reach significance (Fig. 3 B-D). However, when analysing the area of the spines in the different cultures, we found a significant increase in the area of NCAM2.1 overexpressing spines. This increment was not observed when neurons overexpressed the GPI-anchored isoform NCAM2.2 (Fig. 3. B, E-F). Conversely, we found that NCAM2 silencing led to a significant reduction in the area of spines compared to the controls (Fig. 3. B, E-F).

Α



Figure 3. Modulation of dendritic spine area by NCAM2 expression in organotypic cultures.

A) Schematic representation of the preparation, transfection and analysis of organotypic cultures. Hippocampal slices were obtained from P6-P7 rats and biolistically transfected DsRed2/pcDNA3.1, with the following combinations of plasmids: DsRed2/pcNCAM2.1, DsRed2/pcNCAM2.2, DsRed2/ShCnt and DsRed2/ShNCAM2. Transfected neurons from the CA1 were analyzed by real time confocal microscopy to determine the density, area and motility of the spines. B) Representative images of dendrites transfected with control (pcDNA3.1 or ShCnt), Neam2.1- and Neam2.2overexpressing vectors (pcNCAM2.1 or pcNCAM2.2) and Ncam2 silencing vector (ShNCAM2). C-D) Quantifications of the density of dendritic spines in control and Ncam2-overexpressing (C) or Ncam2-silencing (D) conditions. E-F) Graphs showing the mean area of dendritic spines in control and Ncam2-overexpressing (E) or Ncam2-silencing (F) conditions. N= 4 independent experiments, 5-10 dendrites per condition. Data are presented as mean ± SEM; dots represent mean values for individual experiments. t-Student test or One-way ANOVA with Tukey's comparison post-hoc test; *P<0.05, ** P<0.01. Blue arrowheads label dendritic spines with an increased area compared to controls. Purple arrowheads label dendritic spines with a decreased area compared to controls. Scale bar: 5 um.

To gain insight into the events triggered by NCAM2 overexpression or silencing, we investigated how changes in the levels of the protein affected the motility of spines under physiological conditions. The motility was determined using the macro *EstimateDynamicDiff* that evaluates the relative position of dendritic spines over time quantifying the variations in the occupied pixels of the image. Specifically, we quantified the differences detected between intervals of 2 min and 6 min. The results showed no significant differences between control and *Ncam2*-overexpressing or between control and *Ncam2*-silencing conditions at the different time intervals analysed (**Fig. 4 A-E**). However, the neurons transfected with the pc-NCAM2.1 or ShNCAM2 vectors tend to display a higher motility at 2 min (**Fig. 4 A-C**) and 6 min (**Fig. 4 A, D-E**) time intervals.

Taken together, the results obtained when analysing organotypic cultures suggest that alterations in *Neam2* expression could affect the dynamics of dendritic spines leading to modifications in the area of the postsynaptic compartments.

Α





A) Time course showing the changes in dendritic spines from dendrites of neurons transfected with control (pcDNA3.1 or ShCnt), *Ncam2.1* or *Ncam2.2*-overexpressing and ShNCAM2 vectors in intervals of two minutes. **B-C)** Estimation of dendritic spine motility in control and *Ncam2*-overexpressing conditions according to the changes in relative position of spines in time intervals of two minutes (C) or six minutes (D). **D-E)** Estimation of dendritic spine motility in control and *Ncam2*-silencing conditions according

to the changes in relative position of spines in time intervals of two (D) or six (C) minutes. Arrowheads label dendritic spines that changed over time. N= 4 independent experiments, 5-10 dendrites per condition.Data are presented as mean \pm SEM; dots represent mean values for individual experiments. t-Student test (*Ncam2*-silencing) or One-way ANOVA (*Ncam2*-overexpressing); Tukey's comparison post-hoc test; P>0.05. Scale bar: 5 µm.

DISCUSSION

CAMs are key structural elements of the synaptic compartments necessary for synaptic function and plasticity during development and adulthood (Südhof, 2018). In the present study, we demonstrate that NCAM2 modulates dendritic spine formation and maintenance in the DG granule cells and in the pyramidal hippocampal neurons.

NCAM2 expression starts during the development and achieves maximum levels around the postnatal day 21 (P21) (Parcerisas et al., 2020). This expression profile correlates with the process of synapse formation that takes place in late developmental and postnatal stages (Südhof, 2018). The levels of the protein are sustained in the adulthood suggesting additional functions of the protein in the maintenance and plasticity of the connections. Our results showing the localization of NCAM2 in the presynaptic and postsynaptic compartments further supports the relevance of NCAM2 in synapse biology and reinforce previous data reporting the presence of NCAM2 in glutamatergic synapses to participate in glutamate receptor positioning (Leshchyns'Ka et al., 2015).

Considering the expression and localization of NCAM2, as well as the involvement of other members of the Ig superfamily in synapse formation and plasticity, our main objective was to investigate the potential implications of NCAM2 in the modulation of postsynaptic plasticity, with a particular focus in the regulation of dendritic spines. Long-term downregulation of *Ncam2 in vitro* and *in vivo* has revealed that NCAM2 disruption affects the formation and/or maintenance of dendritic spines decreasing its density. Furthermore, the silencing of the protein in organotypic cultures resulted in a dendritic spine shrinkage. Interestingly, more temporally restricted depletion of the protein does not significantly decrease the number of spines but causes dendritic shrinkage. The lack of NCAM2 in the postsynaptic compartment could cause the disassembly of glutamatergic spines (Leshchyns'Ka et al., 2015) impacting the correct functioning of the synapse. Contrariwise, the alterations provoked by sustained overexpression

of NCAM2 are less relevant. Our results revealed no significant changes in the number of spines when NCAM2 was overexpressed but an increase of its area. The effect of NCAM2 overexpression in the area of spines was limited to NCAM2.1, the transmembrane isoform with a cytoplasmatic cue that directly interacts with intracellular effectors (Parcerisas et al., 2021). Interestingly, in cortical neurons the overexpression of NCAM2 also causes a decrease in the maturation of synapses by increasing the instability of dendritic protrusions (Sheng et al., 2019). The alterations in dendritic spines size when NCAM2 levels are modified were not translated into significant variations in the motility of spines under physiological conditions and short time intervals in the organotypic slices. This could indicate that the remodeling mechanisms of spines activated by changes in NCAM2 require longer time intervals to be detected. Anyhow, the proposed role for NCAM2 in the maintenance of postsynaptic structures is compatible to that of other adhesion molecules. Several CAMs have also been related to the regulation of spine numbers and morphology including L1CAM (Murphy et al., 2023), CD44 (Roszkowska et al., 2016) or Cadherins (Togashi et al., 2002). The homologous NCAM1 is also implicated in the performance of dendritic spines (Leshchyns'ka & Sytnyk, 2016; Shapiro et al., 2007; Sytnyk et al., 2017).

The mechanisms underlying the synaptic changes mediated by NCAM2 are still not fully understood. CAMs not only contribute to the construction of the synaptic structure but also participate in signal transduction, becoming essential components for ensuring proper synaptic activity (Missler et al., 2012; Südhof, 2018). Different cell adhesion molecules are localized in the synaptic junctions where they organize the composition and function of the synaptic transmission machinery (Hale et al., 2023; Roszkowska et al., 2016). The extracellular domain of the molecules establishes trans-interactions between the synaptic membranes that allows the initial contacts between synaptic compartments and the formation of synapses. Additionally, clustering of synaptic adhesion molecules is necessary for synaptic stabilization and maintenance. The depletion of the synaptic molecules led to insufficient levels of adhesion that disrupt synapse organization and decreases the number of dendritic spines (Hale et al., 2023). Indeed, the proteolytic cleavage of NCAM2 induced by the β -amyloid causes synapses loss (Leshchyns'Ka et al., 2015). Other examples include deletions in Neuroligins (NLGNS) or Neurexins (NRXNS) (Chen et al., 2017; Zhang et al., 2018) that impede the proper organization and performance of synapses. Members of the Ig superfamily such as L1CAM, NrCAM or NCAM1 regulate the stabilization of synapses through different mechanisms counting the indirect reorganization of the actin cytoskeleton (Duncan et al., 2021).

Extracellular signals transduced by CAMs could also modify the biology of dendritic spines through the activation of different signaling pathways that converge in the reorganization of the spine cytoskeleton. In previous work, we characterized the interactions of NCAM2 with proteins involved in the regulation of synapses including s cytoskeleton proteins, actin, actin binding proteins or signaling molecules such as CaMKII or 14-3-3 (Parcerisas et al., 2021). It has been described that NCAM2 could promote increments in the levels of calcium through the activation of L-type voltage dependent calcium channels (VDCCs). These type of channels located along the axons and dendrites of mature neurons participate in the regulation of spine morphology (Sheng et al., 2013). Calcium influx via VCDCC controls the CaMKll complex, which is crucial for the modulation of synapse formation and dendritic spines plasticity. An increase in the levels of intracellular calcium activate the CaMKII which causes the remodeling of the actin cytoskeleton and the restructuration of the spine through different signaling pathways (Okamoto et al., 2009). Therefore, the modifications in dendritic spines caused by NCAM2 could be vehiculated by direct or indirect modifications of the actin cytoskeleton. Finally, CAMs could also regulate dendritic-spine dependent plasticity through modifications in the neurotransmitter release or the induction of transcriptional and translational changes. Indeed, we previously revealed the interaction of NCAM2 with elongation factors that could participate in the local protein synthesis necessary for synaptic plasticity (Parcerisas et al., 2021).

The functional significance of the observed alterations in dendritic spines caused by NCAM2 needs to be further investigated. Electrophysiological studies conducted on knock-out NCAM2 mice in the olfactory system showed no alterations in the excitatory synaptic input in mitral/tufted cells but a reduced synchrony in neural activity (Borisovska et al., 2011). In cortical neurons, no additional electrophysiological and behavioral studies have been conducted in the cortex or the hippocampus of those animals. However, the dendritic spines dysfunction present in different neurodevelopmental and neurodegenerative diseases associated with Ncam2 suggest possible cognitive impairments caused by the discussed modifications. Patients with ASD present an altered dendritic spines density together with changes in dendritic spines morphology while patients with DS and schizophrenia display reduced number of spines (Phillips & Pozzo-miller, 2016). The aberrant dendritic phenotypes could be explained by defective pruning mechanisms in which CAMs such as NCAM1 or L1CAM are implicated (Sytnyk et al., 2017; Varbanov & Dityatev, 2017). Moreover, genome-wide association studies have proposed Ncam2 as a risk gene in AD, a neurodegenerative disorder characterized by the loss of synapses. Analysis of the expression of NCAM2 in mouse models of the disease and human samples revealed reduced levels of NCAM2 in the synaptic compartments that could be explained by the proteolysis of the protein induced by the β -amyloid. The depletion of the synaptic NCAM2 could led to the disassembly of synapses turning NCAM2 into a candidate molecule responsible for the characteristic synaptic loss of the disease (Leshchyns'Ka et al., 2015),

Taken together, our findings strongly indicate that maintaining appropriate levels of NCAM2 is necessary for synapse formation and maintenance in the adulthood. We demonstrate that the downregulation of NCAM2 leads to a reduction in dendritic spines numbers both *in vivo* and in hippocampal cultures, as well as affect the area of spines in organotypic cultures. These results significantly enhance the understanding of the role of NCAM2 in synaptic properties and provide valuable insights to better comprehend the molecular mechanisms underlying pathologies with synaptic affectations.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

AUTHORS CONTRIBUTION

E.S., L.P., A.O-G and A.P. conceived and designed the study. A.O-G. and A.P. performed most of the experiments and analyzed data. M.B participated in some experiments. A.O-G., A.P., M.B., L.P., and E.S. wrote the manuscript. All authors read and revised the manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science, to E.S and L.P. (PID2019-106764RB-C21/ AEI/ 10.13039/501100011033) and to A.O.-G (BES-2017-080570).; from the Spanish Ministry of health (ISCIII-CIBERNED) and from the Secretariat of Universities and Research of the Department of Economy and Knowledge of the Generalitat de Catalunya to A.P.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Tosi (microscopy facility of the IRB-Barcelona) for FIJI macro design; L. Bardia, A. Lladó (microscopy facility of the IRB-Barcelona) and Bosch. M (microscopy facilities University of Barcelona) for support and technical assistance; M. Pérez (Universitat Internacional de Catalunya) for technical support in viral production; the members of the Department of Cell Biology, Physiology and Immunology (University of Barcelona); and members of the Soriano lab for experimental help and comments.

ABBREVIATIONS

AD	Alzheimer's disease
ANOVA	Analysis of variance
ASD	Autism Spectrum Disorder
CAM	Cell adhesion molecule
CaMKII	Calcium/Calmodulin kinase II
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CNS	Central nervous system
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamidine
DIV	Days in vitro
DG	Dentate gyrus
DNA	Deoxyribonucleic acid
DS	Down syndrome
Е	Embryonic day
EGF	Epidermal growth factor
GC	Granule cell
GFP	Green fluorescent protein
GL	Granule layer
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Н	Hilus
Нр	Hippocampus
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
L1CAM	L1 cell adhesion molecule
ML	Molecular layer
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
NCAM2	Neural cell adhesion molecule 2
NrCAM	Neuronal cell adhesion molecule
NGS	Normal goat serum

NHS	Normal horse serum
NSC	Neural stem cell
Ob	Olfactory bulb
Р	Postnatal day
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffer saline
PFA	Paraformaldehyde
RT	Room temperature
SynCAM	Synaptic cell adhesion molecule

REFERENCES

- Alenius, M., & Bohm, S. (2003). Differential function of RNCAM isoforms in precise target selection of olfactory sensory neurons. *Development (Cambridge, England)*, 130(5), 917–927. 10.1242/dev.00317
- Borisovska, M., McGinley, M. J., Bensen, A., & Westbrook, G. L. (2011). Loss of olfactory cell adhesion molecule reduces the synchrony of mitral cell activity in olfactory glomeruli. *The Journal of Physiology*, 589(8), 1927–1941. 10.1113/jphysiol.2011.206276
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014).
 Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82(2), 444–459. 10.1016/j.neuron.2014.03.021
- Chazeau, A., Garcia, M., Czöndör, K., Perrais, D., Tessier, B., & Lippincottschwartz, J. (2015). Mechanical coupling between transsynaptic N-cadherin adhesions and actin flow stabilizes dendritic spines. *Molecular Biology of the Cell*, 26, 859–873. 10.1091/mbc.E14-06-1086
- Chen, L., Jiang, M., & Zhang, B. (2017). Conditional Deletion of All Neurexins Defines Diversity of Essential Synaptic Organizer Functions for Neurexins Article Conditional Deletion of All Neurexins Defines Diversity of Essential Synaptic Organizer Functions for Neurexins. *Neuron*, 94, 611– 10.1016/j.neuron.2017.04.011
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2007). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology 2008 33:1*, 10.1038/sj.npp.1301559
- Dalva, M., McClelland, A., & Kayser, M. (2007). Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(3), 206–220. 10.1038/nrn2075
- Dityatev, A., Dityateva, G., Sytnyk, V., Delling, M., Toni, N., Nikonenko, I., Muller, D., & Schachner, M. (2004). Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule Promotes Remodeling and Formation of Hippocampal Synapses. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9372–9382. 10.1523/jneurosci.1702-04.2004
- Dorostkar, M. M., Zou, C., Blazquez-Llorca, L., & Herms, J. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer 's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathologica*, *130*(1), 1–19. 10.1007/s00401-015-1449-5

- Duncan, B. W., Murphy, K. E., & Maness, P. F. (2021). Molecular Mechanisms of L1 and NCAM Adhesion Molecules in Synaptic Pruning, Plasticity, and Stabilization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. 10.3389/fcell.2021.625340
- Forrest, M. P., Parnell, E., & Penzes, P. (2018). Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nature Publishing Group*, 19(4), 215–234. 10.1038/nrn.2018.16
- Hale, W. D., Südhof, T. C., & Huganir, R. L. (2023). Engineered adhesion molecules drive synapse organization. PNAS, 120(3). 10.1073/pnas.
- Herms, J., & Dorostkar, M. M. (2016). Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases. Nnual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 2, 11(1), 221–252. 10.1146/annurev-pathol-012615-044216
- Kilinc, D. (2018). The emerging role of mechanics in synapse formation and plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 483. 10.3389/fncel.2018.00483
- Kimura, R., Kamino, K., Yamamoto, M., Nuripa, A., Kida, T., Kazui, H., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Yamagata, H., Tabara, Y., Miki, T., Akatsu, H., Kosaka, K., Funakoshi, E., Nishitomi, K., Sakaguchi, G., Kato, A., Hattori, H., ... Takeda, M. (2007). The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between β-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Human Molecular Genetics*, 16(1), 15–23. 10.1093/hmg/ddl437
- Kulahin, N., Kristensen, O., Rasmussen, K. K., Olsen, L., Rydberg, P., Vestergaard, B., Kastrup, J. S., Berezin, V., Bock, E., Walmod, P. S., & Gajhede, M. (2011). Structural Model and trans-Interaction of the Entire Ectodomain of the Olfactory Cell Adhesion Molecule. *Structure*, 19(2), 203– 211. 10.1016/j.str.2010.12.014
- Kulahin, N., & Walmod, P. S. (2010). The neural cell adhesion molecule NCAM2/OCAM/RNCAM, a close relative to NCAM. Advances in Experimental Medicine and Biology, 663, 403–420. 10.1007/978-1-4419-1170-4_25
- Leshchyns'Ka, I., Liew, H. ., Shepherd, C., Halliday, G. ., Stevens, C. ., Ke, Y. D., Ittner, L. M., & Sytnyk, V. (2015). Aβ-dependent reduction of NCAM2mediated synaptic adhesion contributes to synapse loss in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, *6*, 8836. 10.1038/ncomms9836

- Leshchyns'ka, I., & Sytnyk, V. (2016). Reciprocal interactions between cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily and the cytoskeleton in neurons. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4. 10.3389/fcell.2016.00009
- Magee, J. C., & Grienberger, C. (2020). Synaptic Plasticity Forms and Functions. Annual Review of Neuroscience, 43, 95–117. h10.1146/annurev-neuro-090919-022842
- Missler, M., Su, T. C., & Biederer, T. (2012). Synaptic Cell Adhesion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*, 1–18. 10.1101/cshperspect.a005694
- Molloy, C. A., Keddache, M., & Martin, L. J. (2005). Evidence for linkage on 21q and 7q in a subset of autism characterized by developmental regression. *Molecular Psychiatry*, 10(8), 741–746. 10.1038/sj.mp.4001691
- Murphy, K. E., Wade, S. D., Sperringer, J. E., Mohan, V., Duncan, B. W., Zhang, E. Y., Lutz, D., Schachner, M., & Maness, P. F. (2023). The L1 cell adhesion molecule constrains dendritic spine density in pyramidal neurons of the mouse cerebral cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 17:111525, 1–11. h10.3389/fnana.2023.1111525
- Okamoto, K., Bosch, M., & Hayashi, Y. (2009). The Roles of CaMKII and F-Actin in the Structural Plasticity of Dendritic Spines: A potential Molecular Identity of a Synaptic Tag? *Physiology*, 24(6), 357–366. 10.1152/physiol.00029.2009
- Paoloni-Giacobino, A., Chen, H., & Antonarakis, S. E. (1997). Cloning of a novel human neural cell adhesion molecule gene (NCAM2) that maps to chromosome region 21q21 and is potentially involved in Down syndrome. *Genomics*, 43(1), 43–51. 10.1006/geno.1997.4782
- Parcerisas, A., Ortega-gascó, A., Hernaiz-llorens, M., Odena, M. A., Ulloa, F., de Oliveira, E., Bosch, M., Pujadas, L., & Soriano, E. (2021). New partners identified by mass spectrometry assay reveal functions of NCAM2 in neural cytoskeleton organization. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14). 10.3390/ijms22147404
- Parcerisas, A., Pujadas, L., Ortega-Gascó, A., Perelló-Amorós, B., Viais, R., Hino, K., Figueiro-Silva, J., La Torre, A., Trullás, R., Simó, S., Lüders, J., & Soriano, E. (2020). NCAM2 Regulates Dendritic and Axonal Differentiation through the Cytoskeletal Proteins MAP2 and 14-3-3. *Cerebral Cortex*, 30(6), 3781–3799. 10.1093/cercor/bhz342

- Petit, F., Plessis, G., Decamp, M., Cuisset, J. M., Blyth, M., Pendlebury, M., & Andrieux, J. (2015). 21q21 deletion involving NCAM2: Report of 3 cases with neurodevelopmental disorders. *European Journal of Medical Genetics*, 58(1), 44–46. 10.1016/j.ejmg.2014.11.004
- Phillips, M., & Pozzo-miller, L. (2016). Dendritic spine dysgenesis in Autism Related Disorders. *Neuroscience Letters*, 601, 30–40. 10.1016/j.neulet.2015.01.011.Dendritic
- Rasmussen, K. K., Falkesgaard, M. H., Winther, M., Roed, N. K., Quistgaard, C. L., Teisen, M. N., Edslev, S. M., Petersen, D. L., Aljubouri, A., Christensen, C., Thulstrup, P. W., Lo Leggio, L., Teilum, K., & Walmod, P. S. (2018). NCAM2 Fibronectin type-III domains form a rigid structure that binds and activates the Fibroblast Growth Factor Receptor. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. 10.1038/s41598-018-27089-7
- Reza-Zaldivar, E. E., Hernández-Sápiens, M. A., Minjarez, B., Gómez-Pinedo, U., Sánchez-González, V. J., Márquez-Aguirre, A. L., Canales-Aguirre, A. A., Sossa, J. H., & Canales-Aguirre, A. A. (2020). Dendritic Spine and Synaptic Plasticity in Alzheimer 's Disease : A Focus on MicroRNA. *Frontiers in Cell* and Developmental Biology, 8. 10.3389/fcell.2020.00255
- Rochefort, N. L., & Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. EMBO Reports, 13(8), 699–708. 10.1038/EMBOR.2012.102
- Roszkowska, M., Skupien, A., Wójtowicz, T., Konopka, A., Gorlewicz, A., & Ginsberg, M. H. (2016). CD44: a novel synaptic cell adhesion molecule regulating structural and functional plasticity of dendritic spines. *Molecular Biology of the Cell*, 27, 4055–4066. 10.1091/mbc.E16-06-0423
- Runge, K., Cardoso, C., & de Chevigny, A. (2020). Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 36. 10.3389/fnsyn.2020.00036
- Scholz, C., Steinemann, D., Mälzer, M., Roy, M., Arslan-Kirchner, M., Illig, T., Schmidtke, J., & Stuhrmann, M. (2016). NCAM2 deletion in a boy with macrocephaly and autism: Cause, association or predisposition? *European Journal of Medical Genetics*, 59(10), 493–498. 10.1016/j.ejmg.2016.08.006
- Shapiro, L., Love, J., & Colman, D. R. (2007). Adhesion molecules in the nervous system: Structural insights into function and diversity. In *Annual Review of Neuroscience*, 30, 451–474. Annual Reviews. 10.1146/annurev.neuro.29.051605.113034

- Sheng, L., Leshchyns'ka, I., & Sytnyk, V. (2013). Cell adhesion and intracellular calcium signaling in neurons. *Cell Communication and Signaling 2013 11:1*, 11(1), 1–13. 10.1186/1478-811X-11-94
- Sheng, L., Leshchyns'ka, I., & Sytnyk, V. (2019). Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2)-Induced c-Src-Dependent Propagation of Submembrane Ca 2+ Spikes Along Dendrites Inhibits Synapse Maturation. *Cerebral Cortex*, 29(4), 1439–1459. 10.1093/cercor/bhy041
- Sheng, L., Leshchyns'Ka, I., & Sytnyk, V. (2015). Neural cell adhesion molecule 2 promotes the formation of filopodia and neurite branching by inducing submembrane increases in Ca2+ levels. *Journal of Neuroscience*, 35(4), 1739– 1752. 10.1523/jneurosci.1714-14.2015
- Subramanian, J., Savage, J. C., & Tremblay, M.-ève. (2020). Synaptic Loss in Alzheimer 's Disease: Mechanistic Insights Provided by Two-Photon in vivo Imaging of Transgenic Mouse Models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. 10.3389/fncel.2020.592607
- Südhof, T. C. (2018). Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron*, 100(2), 276–293. 10.1016/j.neuron.2018.09.040
- Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., & Schachner, M. (2017). Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily Regulate Synapse Formation, Maintenance, and Function. In *Trends in Neurosciences*, 40(5), 295–308. 10.1016/j.tins.2017.03.003
- Teixeira, C. M., Kron, M. M., Masachs, N., Zhang, H., Lagace, D. C., Martinez, A., Reillo, I., Duan, X., Bosch, C., Pujadas, L., Brunso, L., Song, H., Eisch, A. J., Borrell, V., Howell, B. W., Parent, J. M., & Soriano, E. (2012). Cellautonomous inactivation of the reelin pathway impairs adult neurogenesis in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 32(35), 12051–12065. 10.1523/jneurosci.1857-12.2012
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., & Takeichi, M. (2002). Cadherin Regulates Dendritic Spine Morphogenesis. *Neuron*, 35, 77– 89. 10.1016/s0896-6273(02)00748-1
- Togashi, H., Sakisaka, T., & Takai, Y. (2009). Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adhesion & Migration*, 3(1), 29. 10.4161/CAM.3.1.6773
- Varbanov, H., & Dityatev, A. (2017). Molecular and Cellular Neuroscience Regulation of extrasynaptic signaling by polysialylated NCAM : Impact for synaptic plasticity and cognitive functions. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 81, 12–21. 10.1016/j.mcn.2016.11.005
- Von Campenhausen, H., Yoshihara, Y., & Mori, K. (1997). OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. *NeuroReport*, 8(11), 2607–2612. 10.1097/00001756-199707280-00037
- Winther, M., Berezin, V., & Walmod, P. S. (2012). NCAM2/OCAM/RNCAM: Cell adhesion molecule with a role in neuronal compartmentalization. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(3), 441–446. 10.1016/j.biocel.2011.11.020
- Yang, Y., & Calakos, N. (2013). Presynaptic long-term plasticity. Frontiers in Synaptic Neuroscience, 5. 10.3389/fnsyn.2013.00008
- Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tamada, A., Fujita, H., Hayashi, H., Kagamiyama, H., & Mori, K. (1997). OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *Journal of Neuroscience*, 17(15), 5830–5842. 10.1523/jneurosci.17-15-05830.1997
- Yuste, R., Bonhoeffer, T., & Planck, M. (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastuctural and imaging studies. *Nature Neuroscience*, 5, 24– 34. 10.1038/nrn1300
- Zhang, P., Lu, H., Peixoto, R. T., Sabatini, B. L., Wong, R. O. L., Zhang, P., Lu, H., Peixoto, R. T., Pines, M. K., Ge, Y., Oku, S., & Siddiqui, T. J. (2018).
 Heparan Sulfate Organizes Neuronal Synapses through Neurexin Partnerships Article Heparan Sulfate Organizes Neuronal Synapses through Neurexin Partnerships. *Cell*, 174(6), 1450-1464. 10.1016/j.cell.2018.07.002



Les CAMs conformen un grup funcionalment i estructuralment divers de proteïnes necessàries per al desenvolupament i el manteniment de l'enorme complexitat del sistema nerviós. Les diferents famílies que integren les CAMs participen en funcions que van des de la regulació de les NSCs i la formació de neurones, a la seva diferenciació, maduració i integració funcional en els circuits preexistents (Benson et al., 2000; Missler, 2003; Yamagata et al., 2003) (Bian 2013; Porlan 2014; Sudhof; Missler). Així doncs, els programes d'expressió temporal i espacial de les CAMs permeten la construcció i la conservació d'un sistema extraordinàriament intricat, en el qual milers de neurones es troben interconnectades de manera específica per sostenir l'estructura i la funció del sistema.

En el cas de NCAM2, descoberta originalment en el bulb olfactiu, les investigacions s'han centrat en estudiar la seva funció en aquesta regió deixant palesa la seva rellevància fisiològica (Alenius i Bohm, 1997; Paoloni-Giacobino et al., 1997; Von Campenhausen et al., 1997). Al bulb olfactiu en desenvolupament, la proteïna és expressada per neurones olfactives sensorials i cèl·lules mitrals en les quals controla la correcta formació dels compartiments axo-dendrítics, la fasciculació selectiva dels axons i el correcte establiment de contactes amb les seves dianes. En definitiva, NCAM2 en el desenvolupament col·labora en l'organització regional del bulb necessària per a la formació de les connexions entre el bulb i l'epiteli olfactiu (Treloar et al., 1999).

Els estudis que analitzen la funció de NCAM2 fora de la regió olfactiva, però, són més limitats. S'ha descrit que podria participar en la formació de neurites i sinapsis en neurones corticals, així com, en la regulació de la proliferació dels progenitors neuronals de la medul·la espinal. Tot i així, les seves implicacions en els processos característicament regulats per les CAMs en el còrtex i l'hipocamp havien estat poc explorats. Els objectius d'aquesta tesi s'han centrat, conseqüentment, en analitzar les implicacions funcionals de NCAM2 en processos clau del desenvolupament neuronal i la plasticitat adulta. Els resultats han desvelat la rellevància de la proteïna en la diferenciació i migració de les neurones corticals durant la formació del sistema nerviós. Alhora, hem pogut observar que la proteïna es necessària per al manteniment i la plasticitat del sistema nerviós adult regulant les NSCs adultes durant el procés de neurogènesi i la plasticitat sinàptica associada a les espines dendrítiques.

Capítol 1. NCAM2 en el desenvolupament neuronal

Els resultats obtinguts en aquesta tesi mostren un paper destacat de la proteïna en diferents processos del desenvolupament neuronal com la migració i la diferenciació de les neurones.

1.1. La proteïna NCAM2 en la regulació de les NSCs embrionàries

Les NSCs resideixen en zones neurogèniques que regulen el seu manteniment, divisió i diferenciació a través de la integració de múltiples senvals intrínsecs i extrínsecs. Durant el desenvolupament embrionari, la zona neurogènica principal és la VZ en la qual hi trobem una població heterogènia de progenitors neurals (Agirman et al., 2017). Entre els components de la VZ hi ha les CAMs, molècules que integren i transmeten els senvals de l'entorn a les NSCs a través de l'establiment d'interaccions homofiliques o heterofiliques (Morante-Redolat i Porlan 2019; Bjornsson et al., 2015). Les interaccions mediades per les CAMs entre cèl·lules o amb la matriu extracel·lular regulen el comportament de les NSCs. De fet, canvis en l'expressió de CAMs com les cadherines o les integrines, provoquen la pèrdua de la polaritat de les NSCs, la disrupció del nínxol neurogènic i canvis en les taxes de proliferació dels progenitors (Agustín-Durán et al., 2021; Ferent et al., 2020; Morante-Redolat & Porlan, 2019). Membres de la família de les IgCAMs entre els quals hi ha la L1CAM o la NCAM1 també son importants per a la regulació de la proliferació de les NSCs i la seva diferenciació neuronal (Bian, 2013). Per aquest motiu, vam voler determinar la implicació de la proteïna NCAM2 en la formació del còrtex.

L'expressió de la proteïna NCAM2 en els progenitors neurals va ser modificada per mitjà d'electroporacions in utero el dia 14.5 del desenvolupament embrionari dels ratolins. Els resultats presentats no mostren grans canvis en la laminació del còrtex suggerint funcions discretes de la proteïna en la regulació dels progenitors embrionaris. L'expressió de la proteïna s'inicia entorn el dia 14 del desenvolupament embrionari (E14) dels ratolins, principalment a la MZ, a la SP i a la VZ. Aquest patró d'expressió en el temps i l'espai suggereix un paper més destacat de la proteïna en l'establiment de la polarització i la migració de les neurones que en la regulació de la proliferació dels progenitors. L'inici del procés neurogènic en ratolins té lloc entorn el dia 9.5 quan les NECs inicien les primeres rondes de divisió (Agirman et al., 2017). La transició cap a RGCs té lloc entorn el dia 12 de manera que en les primeres etapes de la proliferació de les NECs i RGCs no hi ha nivells detectables de la proteïna NCAM2. Aquests fets podrien indicar que NCAM2 no és necessària per la regulació de la divisió de els NSCs en les etapes inicials. Si es centra l'atenció en etapes neurogèniques posteriors, la modificació dels nivells de NCAM2 tampoc sembla tenir un impacte determinant en la producció de neurones. Els canvis en l'expressió de la proteïna en el dia 14.5 del desenvolupament embrionari per mitjà d'electroporacions *in utero* no afecten dràsticament la generació de noves neurones ni la laminalció del còrtex, quan s'analitza el teixit en el moment del naixement i cinc dies després. Tot i així, podria ser que els canvis desencadenats per la sobreexpressió o silenciament de la proteïna en la regulació dels progenitors fossin més subtils i transitoris, de manera que no puguin ser detectats en etapes postnatals. Per tal de descartar aquesta hipòtesi, els resultats es podrien complementar amb futurs estudis en els quals s'analitzés la població de cèl·lules electroporades a temps més curts després del tractament. A més, seria interessant analitzar marcadors de capes corticals com CUX1 o CTIP2 per determinar possibles vairacions en les poblacions de neurones generades.

Malgrat no detectar canvis importants en el nombre de neurones, les electroporacions *in utero* van revelar implicacions apreciables de la proteïna en altres processos del desenvolupament neuronal com la migració i la diferenciació.

1.2. NCAM2 en el control de la migració neuronal

Del procés de migració en depèn l'apropiada laminació del còrtex i la connectivitat de les neurones. Per aquest motiu, la migració està regulada per múltiples factors que asseguren el correcte posicionament de les cèl·lules i possibiliten la correcta confecció i funció dels circuits corticals. Durant el trajecte, les neurones naveguen a través d'entorns intricats en els quals hi troben diferents tipus cel·lulars. Les interaccions entre les neurones en migració i les cèl·lules de l'entorn com les cèl·lules de Cajal-Retzius permeten assolir amb èxit la destinació final. És per això, que les CAMs tenen un pes important en la migració neuronal ja que faciliten les interaccions entre cèl·lules i amb la matriu extracel·lular (Agustín-Durán et al., 2021; Martinez-Garay, 2020; Moreland & Poulain, 2022). De fet, poden regular diferents etapes del procés: la desunió de les neurones de la VZ, la transició de MP a BP, l'adhesió a les fibres de la glia radial que faciliten la locomoció o la translocació somal terminal (Martinez-Garay, 2020).

Els estudis realitzats per avaluar l'efecte concret de NCAM2 en la migració neuronal mostren com el silenciament de la proteïna afecta la correcta migració de les neurones corticals. Per tal d'investigar-ho, es van realitzar electroporacions *in utero* en embrions d'E14.5. La tècnica permet modificar l'expressió gènica amb una elevada precisió espacial i temporal. D'aquesta manera podem silenciar el gen quan s'inicia la seva expressió durant les etapes de migració i diferenciació corticals. El resultat d'aquest silenciament és un mal posicionament de les cèl·lules amb una major proporció d'elles en les capes II i III del còrtex. En analitzar la vessant contrària, la sobreexpressió de la proteïna també produeix dèficits migratoris, però de menor impacte. Una major expressió de NCAM2 produeix un retard en la

migració de les neurones que en el dia del naixement es troben en capes inferiors a les esperades. Aquest retard, però, es resol en els primers dies postnatals. El conjunt de les dades apunten a la regulació de la migració per part de NCAM2, tot i que, no podem establir amb certesa quina part del procés es troba afectada. La proteïna NCAM2 podria controlar l'establiment inicial de la polaritat, la locomoció a través de les fibres de la glia radial o la translocació somal. Altres CAMs com les cadherines o membres de la superfamília de les Ig com L1, CHL1 o NCAM1 controlen els processos esmentats (Schmid i Maness 2009; Martinez-Garay 2020). Per exemple, la proteïna NCAM1 a través de les modificacions de polisialització (PSA; de polysialic acid) regula la migració. En concret, NCAM1 crea un entorn permissiu que afavoreix el moviment de les cèl·lules durant la migració rostral al bulb olfactiu i afecta la migració tangencial i radial en el còrtex (Angata et al., 2007). La pèrdua d'adhesió provocada pel silenciament de NCAM2 podria afectar les unions amb les fibres de la glia radial i altres cèl·lules de suport, dificultant la locomoció i la translocació somal de les neurones, i fent que quedin posicionades en capes inferiors. En les neurones corticals silenciades, però, no només es va detectar una alteració en el posicionament, sinó que, també, es va observar una morfologia alterada. Les cèl·lules on NCAM2 havia estat silenciada no presentaven la clara dendrita apical característica de les neurones piramidals. En canvi, presentaven múltiples dendrites sorgides del soma neuronal. Aquest fenotip aberrant podria indicar errors en la transició de cèl·lula MP a BP o problemes en la diferenciació neuronal. Alteracions en aquests processos també provoquen disrupcions en la migració de les neurones i podrien explicar el mal posicionament de les cèl·lules en el còrtex. TAG-1 és una molècula d'adhesió important per l'especificació de l'axó in vivo sense la qual no és possible ni la transició de cèl·lula MP a BP ni la migració neuronal. És interessant comentar que TAG-1 és una proteïna ancorada a la membrana a través d'un grup GPI, igual que NCAM2.2. El grup GPI afavoreix la localització de les proteïnes en zones de la membrana plasmàtica riques en lípids conegudes amb el terme anglès de lípids rafts. La proteïna TAG-1 realitza les seves funcions a partir de vies de senvalització específiques de les regions dels *lipids rafts* en les quals hi participa la molècula Src (Kasahara et al. 2000, 2002). La N-cadherina també contribueix a la transció entre MP-BP, concretament, els contactes entre les noves neurones i les RGCs mediats per la Ncadherina contribueixen a l'especificació dels processos líder i cua. L'especificació és possible gràcies a l'activació de les vies de senvalització de Rho i Rac1 i canvis en el citoesquelet (Martinez-Garay, 2020). Podria ser, doncs, que NCAM2 regulés la formació dels processos líder i cua modificant el citoesquelet. Un cop les cèl·lules estan polaritzades, s'inicia el seu moviment a través de les RGCs. NCAM2 podria regular la locomoció de les cèl·lules i la translocació somal. Les cadherines faciliten la unió inicial de les cèl·lules amb les fibres de la glia radial, i tant cadherines com integrines fan possible la interacció entre neurones i fibres durant el trajecte de migració (Martínez-Garay 2020, Duncan 2021). En aquest procés de locomoció, una dels complexs més rellevants és el format per LIS1/NDEL1. La isoforma 14-3-3ξ interacciona amb NDEL1 fent possible la formació del complex LIS1/NDEL1 i afavorint la interacció de LIS1 amb la dineïna. En neurones en migració, la dineïna citoplasmàtica i LIS1 promouen el moviment saltatori nuclear cap al centrosoma a partir de la interacció amb els microtúbuls (Toyo-oka et al., 2003). En l'anàlisi proteòmica hem detectat la interacció de NCAM2 amb diferents isoformes de la 14-3-3, així doncs, NCAM2 també podria ser important pel moviment saltatori i la locomoció depenent de les fibres de la glia radial. L'absència de la proteïna podria dificultar la unió entre neurones i fibres, obstaculitzant la progressió de les neurones. Una última possibilitat és que NCAM2 pariticipi juntament amb NOGO en la regulació de la motilitat, controlant les interaccions repulsives entre les cèl·lules (Schwab, 2010).

En la condició sobreexpressant, no es van observar canvis morfològics en les neurones, de manera que és poc problable que els errors en la migració siguin causats per alteracions en el procés de diferenciació. El retard en el posicionament de les cèl·lules podria ser explicat per un increment en l'adhesió cel·lular. L'expressió de les molècules d'adhesió ha de disminuir inicialment per permetre la desunió de les neurones de les zones neurogèniques. En el cas de la N-cadherina s'observa una disminució dels nivells en les noves neurones que permet el trencament de les unions adherents i la desunió de les cèl·lules de la VZ (Martinez-Garay, 2020). Un augment de la proteïna en la superfície cel·lular podria provocar una major retenció de les cèl·lules en les zones proliferatives i endarrerir el procés de migració.

1.3. Efecte de NCAM2 en la diferenciació neuronal

Les electroporacions *in utero* van desvelar un efecte important de la proteïna en la morfogènesi neuronal. El fenotip dendrític aberrant de les neurones corticals va ser analitzat en profunditat amb cultius neuronals per comprovar fins a quin punt NCAM2 afecta la polarització i la diferenciació d'axons i dendrites. En cultius neuronals d'hipocamp, la regulació a la baixa de les dues isoformes de NCAM2 entre els estadis tres i quatre de Banker (Bentley & Banker, 2016) provoca canvis dràstics en la morfologia neuronal. L'eliminació de la proteïna en el moment clau de l'establiment de polaritat i la identitat d'axons i dendritse, fa que les neurones presentin un arbre dendrític aberrant amb múltiples neurites immadures que s'estenen des del soma. A més, els axons de les neurones silenciades tenen una menor longitud, més ramificacions, i fins i tot, en alguns casos es detecta la presència de més d'un axó. Les múltiples neurites tenen una alta motilitat amb nombroses estructures tipus fil·lopodi en creixement i retracció. L'anàlisi de marcadors típics de dendrita o axó mostra que aquestes prolongacions són

negatives per MAP2, tau o marcadors de neurofilaments. Les seves característiques estructurals i moleculars encaixen amb la definició de proto-dendrites (Kahn et al., 2015).

La diferenciació neuronal és un procés dirigit per la detecció de senyals extracel·lulars i la conversió d'aquests en canvis en el citoesquelet de la cèl·lula que permetin l'elongació de dendrites i axons. Precisament per aquesta raó, és un fenomen altament regulat per les CAMs que actuen d'enllaç directe entre els dominis extracel·lular i intracel·lular. El silenciament de NCAM1 en cultius corticals produeix un fenotip similar al de NCAM2 amb una reducció significativa en la longitud d'axons i dendrites (Frese et al., 2017; Pollerberg et al., 2013). Aquests efectes en el creixement de les neurites i la polarització podrien ser deguts al fet que NCAM1 estimula la polarització i el desenvolupament de l'arbre dendrític promovent el creixement dels filaments d'actina en el con de creixement (Frese et al., 2017). Altres CAMs com la N-cadherina o la TAG-1 també regulen la polarització i diferenciació tant *in vivo*, controlant la transició de MP a BP, com *in vitro* (Namba et al., 2015; Takano et al., 2019). Concretament, si es suprimeix la N-cadherina de les neurones es desbarata la formació del procés líder (Gärtner et al., 2012).

Per comprendre millor els mecanismes moleculars que poden vehicular l'acció de NCAM2 sobre la morfogènesi de les neurones, vam realitzar una anàlisi de proteòmica per descobrir quines són les proteïnes que interaccionen amb NCAM2. L'estudi realitzat va mostrar la interacció de NCAM2 amb desenes de proteïnes importants per la morfogènesi neuronal, entre les quals destaquen els components del citoesquelet d'actina, tubulina i neurofilaments. També, es va revelar la interacció de NCAM2 amb proteïnes reguladores del citoesquelet, entre les quals hi ha proteïnes associades als microtúbuls (MAP1B o MAP2) i proteïnes "*capping*" de l'actina (CAPZA i CAPZB). Aquestes interaccions podrien ajudar a explicar els fenotips dendrítics aberrants observats en les neurones amb silenciament de NCAM2. D'una banda, la interacció directa o indirecta amb l'actina podria indicar que NCAM2 regula la formació dels compartiments dendrítics a través del control de la polimerització/despolimerització de l'actina. D'altra banda, NCAM2 podria controlar l'estabilitat dels microtúbuls. Les nostres dates corroboren que la disminució dels nivells de NCAM2 modifica el comportament dels microtúbuls. Les neurites aberrants en les quals s'ha silenciat l'expressió de NCAM2 presenten un menor senyal de tubulina, tubulina acetilada i tubulina detirosinada, així com menors nivells de MAP2. Una possible explicació és que NCAM2 reguli l'estabilització dels microtúbuls a partir de la interacció amb MAP2B i MAP2C (Chen et al., 1992; Bélanger et al., 2002; Melkova, 2019). El silenciament de la proteïna podria provocar una desestabilització del citoesquelet de tubulina que comporti problemes en la formació de les dendrites i, sobretot, en l'enlongació i ramificació de l'axó, ja que els axons presenten uns microtúbuls més estables. En aquesta direcció, es va observar que l'estabilització dels microtúbuls amb taxol podia rescatar el fenotip aberrant. Així doncs, el contacte de NCAM2 amb les proteïnes MAP2B i MAP2C aprop de la membrana podria induir canvis en la citoesquelet exterior que fossin transmesos al citoesquelet central i acabessin afectant al conjunt de l'estructura (Kapitein & Hoogenraad, 2015; Iryna Leshchyns'Ka & Sytnyk, 2016). Una altra possibilitat és que NCAM2 reguli de manera indirecta la unió de MAP2 als microtúbuls. En qualsevol dels casos, el que s'ha observat és que la sobreexpressió de MAP2B i MAP2C és suficient per rescatar el fenotip dendrític aberrant. Cal apuntar també que la interacció amb MAP1B, una proteïna important per al control de les ramificacions de l'axó, podria contribuir als canvis en la formació de l'axó induïts per NCAM2 (Halpain i Dehmelt 2006).

Si ens fixem en la sobreexpressió, en el nostre model experimental no observem canvis significatius en els compartiments neuronals deguts a un augment de la proteïna. Tot i així, altres grups han observat que, l'agrupament de NCAM2 a la membrana promou la formació de fil·lopodis i les ramificacions de les dendrites induint un augment en el flux de calci depenent dels VDCCs que activa la CaMKII i la quinasa Src (L. Sheng et al., 2015). La interacció de la NCAM2 amb les isoformes α i β de la CaMKII també fou detectada en l'estudi proteòmic. Durant el procés de polarització, l'activació de la CaMKII regula l'activitat de la cofilina a través de RhoA (Lin i Redmond 2009; Namba et al. 2015). D'aquesta manera, la CaMKII pot regular la formació de les dendrites i participar en els mecanismes de refinament. Així doncs, per mitjà de la interacció amb la CaMKII, NCAM2 podria participar en la regulació de la cofilina i controlar la despolimerització del citoesquelet d'actina. La sobreexpressió de la isoforma de la CaMKIIB, en cultius on s'ha silenciat NCAM2, pot rescatar parcialment les alteracions morfològiques provocades per l'eliminació de NCAM2. Aquesta observació suggereix que la proteïna podria regular el creixement neurític en part per mitjà de la CaMKII, o bé, regular la transició de creixement a retracció de les dendrites controlada per la CaMKIIß (Puram et al., 2011).

Un altre possible mecanisme molecular d'acció de NCAM2 és la via de la proteïna bastida 14-3-3. NCAM2 interacciona amb les isoformes 14-3-3ζ,14-3-3ξ i 14-3-3γ que poden participar en les principals vies de senyalització de control de la polarització de les cèl·lules. Per exemple, les isoformes de la 14-3-3 poden regular la ubiqüitinització i la degradació de la catenina que participa en l'activació de la família de Rho GTPases, afectant indirectament la fosforil·lació de LIMK1 i la Cofilina i, per tant, la dinàmica del citoesquelet d'actina (Cornell & Toyo-oka, 2017). També, s'ha descrit que pot interaccionar i regular les proteïnes associades als microtúbuls com la MAP2. La sobreexpressió de la proteïna 14-3-3 és suficient

per recuperar la correcta morfologia neuronal en les cèl·lules on NCAM2 ha estat eliminada.

Els mecanismes moleculars descrits poden ser activats per la isoforma NCAM2.1 que té un domini intracel·lular amb el qual pot contactar amb molècules citosòliques. En canvi, la isoforma NCAM2.2 que s'uneix a la membrana per un grup GPI hauria d'utilitzar altres vies. S'ha descrit que la proteïna homòloga NCAM1 pot interaccionar amb altres proteïnes de membrana o receptors, com el FGFR, i regular el creixement de les neurites a través de l'activació de la via de Ras-MAPK (Kim Krighaar Rasmussen et al., 2018). En NCAM1, la interacció amb FGFR controla el tràfic intracel·lular del receptor i estimula així la migració i la morfogènesi neuronal (Chernyshova et al., 2011; Francavilla et al., 2009). En les nostres condicions experimentals, els efectes de NCAM2 en el creixement neurític serien independents de FGFR. També, és poc probable un efecte sinèrgic per acció de la interacció entre les dues isoformes de NCAM2 en la mateixa cèl·lula, degut a l'estructura rígida dels dominis d'Ig que afavoreixen les interaccions trans enfront de les cis (Kulahin et al., 2011; Kim Krighaar Rasmussen et al., 2018). Així doncs, tot i que podrien existir altres possibilitats, com la senvalització a través de les vies específiques dels lípid rafts, sembla que l'acció sobre la morfogènesi neuronal seria principalment vehiculada per la isoforma NCAM2.1.

Per últim, en els darrers anys han augmentat les evidències que mostren com les CAMs poden exercir les seves funcions a través de la regulació de l'expressió gènica. Diferents estudis han descrit com el silenciament d'algunes CAMs modifica l'expressió de múltiples gens entre ratolins control i ratolins *knock-out* de proteïnes CAM específiques. Per exemple, la proteïna L1CAM controla els nivells d'expressió de MAP2 de manera que el silenciament de L1CAM disminueix els nivells de MAP2 (Poplawsky et al. 2012). NCAM1 regula canvis en l'activitat i l'expressió de factors activadors i repressors de la transcripció (Kozlova et al., 2020). Alhora, poden modificar la traducció de proteïnes i l'estructura i distribució d'orgànuls implicats en la síntesi proteica (Kozlova et al., 2020). Per tal d'aprofundir en els mecanismes moleculars de NCAM2, seria interessant investigar els canvis en la regulació gènica deguts a alteracions en l'expressió de NCAM2, per exemple, en el ratolí *knock-out* de la proteïna.



Figura 4.1. Efecte de NCAM2 en el desenvolupament neuronal

Representació esquemàtica de les implicacions de NCAM2 en el procés de diferenciació i migració *in vivo* (panell superior) i en el procés de polarització in vitro (panell inferior). *In vivo*, el silenciament de la proteïna altera la morfologia de les neurones corticals i la seva migració cortical. *In vitro*, el silenciament de NCAM2 produeix un fenotip dendrític aberrant amb neurones amb múltiples neurites MAP2 negatives. Els axons de les neurones també són més curts, més ramificats i en alguns casos s'observen 2 o més estructures amb

les característiques morfològiques de l'axó. Aquestes alteracions poden ser degudes a la interacció directa o indirecta de NCAM2 amb les proteïnes del citoesquelet. DIV: dies *in vitro*; IPC: progenitor intermedi; MZ: zona marginal; NEC: cèl·lula neurepitelial; RGC: cèl·lula de la glia radial; SP: subplaca; SVZ: zona subventricular; VZ: zona ventricular. Font: elaboració pròpia.

Capítol 2. NCAM2 en la regulació de la plasticitat sinàptica

Un cop finalitza la construcció del sistema nerviós i l'establiment de milions de interconnexions específiques entre neurones, s'inicien diferents programes d'expressió en el temps i l'espai de CAMs que contribueixen al manteniment i plasticitat de les connexions neuronals (Shapiro et al., 2007).

2.1. NCAM2 en els compartiments sinàptics

Les CAMs són reconegudes reguladores de la formació de les sinapsis durant el desenvolupament embrionari i de la seva preservació i remodelatge en l'etapa adulta (Missler et al., 2012; Südhof, 2018, 2021). El domini extracel·lular de les CAM permet la interacció entre els compartiments pre i postsinàptics donant lloc a una forta adhesió molecular. Els dominis extracel·lulars de les CAMs mostren una estructura formada per unitats repetides dels mateixos mòduls que tenen com a objectiu augmentar el nombre de possibles interaccions, ajudar a creuar la fenedura sinàptica i dotar d'estabilitat mecànica a les unions. En els membres de la família de les IgCAMs les repeticions es donen en els mòduls del tipus Ig i Fn. La proteïna NCAM2 presenta cinc mòduls Ig a través dels quals es formen unions trans entre cèl·lules veïnes. Concretament, les molècules NCAM2 dimeritzen a través dels dominis IgI-IgII establint interaccions recíproques amb una distància intercel·lular d'aproximadament 20 nm que correspon amb la distància observada en les sinapsis químiques (Hormuzdi et al., 2004; Kulahin et al., 2011; Südhof, 2021). En aquest estudi s'ha pogut detectar la colocalització de la proteïna amb marcadors dels compartiments presinàptics (Sinapsina) i postsinàptics (PSD-95) corroborant dades prèviament descrites (I Leshchyns'Ka et al., 2015). De fet, l'expressió de la proteïna NCAM2 s'inicia entorn el dia 14 del desenvolupament i assoleix nivells màxims d'expressió entorn el dia 21 després del naixement. Les sinapsis es formen principalment durant les etapes tardanes del desenvolupament i en els primers estadis postnatals (Südhof, 2021). Un cop formades, el refinament de les connexions té lloc durant l'adolescència, tot i que els fenòmens de formació i eliminació de sinapsis continuen, en menor grau, al llarg de tota la vida. Així doncs, el patró d'expressió temporal de Ncam2 coincideix amb la finestra temporal en la qual maduren les neurones i es formen les connexions sinàptiques. En l'etapa adulta, el manteniment de les sinapsis i la seva remodelació en resposta a l'activitat també estan regulats per molècules d'adhesió. El fet que els nivells de NCAM2 es mantinguin estables durant aquesta etapa, i no disminueixin després del naixement, indiquen un paper destacat també en la regulació de les sinapsis madures.

2.2. Les implicacions de NCAM2 en sinaptogènesi

En cultius neuronals d'hipocamp envellits, s'ha investigat el paper de la proteïna en la formació i el manteniment dels contactes sinàptics. Els nostres resultats mostren com el silenciament de NCAM2 disminueix contundentment les sinapsis funcionals. La sobreexpressió de les dues isoformes del gen, en canvi, no modifica el nombre de sinapsis. Tot i que no podem determinar el mecanisme d'acció de la proteïna, les dades recollides suggereixen la implicació de NCAM2 en la formació i manteniment de les connexions sinàptiques. La formació de les sinapsis inclou una següènca d'esdeveniments que s'inicien amb el reconeixement de la diana i la interacció entre les membranes pre i postsinàptiques; i finalitza amb l'estabilització o l'eliminació dels contactes. Les CAMs funcionen de manera coordinada i no jerarquitzada per assolir una òptima connectivitat (Lim et al., 2022). La presència de NCAM2 en el con de creixement i les estructures postsinàptiques podria contribuir al reconeixement entre les membranes, com s'ha observat en altres IgCAMs (Moreland & Poulain, 2022; Sanes & Zipursky, 2020). Les cadherines, integrines o IgCAMs del con de creixement fan possible el reconeixement de la diana (Moreland & Poulain, 2022; Missler et al., 2012). De fet, els estudis previs en polarització mostren com la proteïna afecta la dinàmica dels cons de creixement. Així doncs, el silenciament de la proteïna podria afectar al reconeixement de la diana i dificultar la formació inicial dels contactes. Les alteracions en la dinàmica del con degudes a l'acció de proteïnes com MAP1 en les neurones silenciades podrien dificultar la navegació de l'axó fins a la diana. A més, NCAM2 també interacciona amb CAPZ, una proteïna reguladora del citoesquelet d'actina que és important per a la regulació del con de creixement (Davis et al., 2009; Sinnar et al., 2014). El menor nombre de proteïnes NCAM2 a la superfície de la cèl·lula també podria dificultar la formació d'unions adhesives entre els compartiments sinàptics. Un cop formats els primers contactes, les CAMs com les neurexines/neuroligines són importants per al manteniment de les estructures i les propietats dels compartiments sinàptics (Südhof, 2018). NCAM2 també podria estar involucrada en l'organització de les sinapsis modificant l'alliberament de neurotransmissors o el transport dels receptors (Missler et al., 2012). La implicació en aquests processos regularia l'establiment de connexions de manera que el silenciament evitaria que es formessin les sinapsis.

Alternativament o complementàriament, NCAM2 podria controlar la maduració i el refinament dels contactes com ho fan les cadherines, contactines, L1CAM o NCAM1 (Duncan et al., 2021; Sanes & Zipursky, 2020; Sytnyk et al., 2006; Togashi et al., 2002). Les molècules de la família de la L1CAM promouen l'estabilitat de les sinapsis a partir de les anquirines. Els components de la matriu extracel·lular com l'àcid hialurònic o els condroitin sulfats també participen en l'estabilització dels contactes mediada per L1CAM i la NCAM1 (Duncan et al., 2021). El col·lapse i refinament de les espines induït per algunes IgCAMs, la CH1 i la NrCAM, és depenent de la Semaforina 3 (Duncan et al., 2021). La pèrdua de L1CAM o algun dels seus efectors citosòlics impedeix la correcta eliminació de les sinapsis inactives i provoca un augment de les espines dendrítiques i les sinapsis excitatòries. Les integrines també contribueixen al refinament de les sinapsis a través del remodelatge del citoesquelet d'actina (Duncan et al., 2021), de fet, la seva inactivació promou l'estabilització de les espines. Els contactes mediats per la proteïna NCAM2 podrien contribuir a estabilitzar les espines dendrítiques a través de modificacions del citoesquelet d'actina. El silenciament de la proteïna podria afectar l'estabilitat de les connexions i afavorir la seva eliminació durant el refinament.

Per acabar de caracteritzar la rellevància de NCAM2 en la formació de les sinapsis, es podrien realitzar assajos com el de la reconstitució de la GFP a través dels compartiments sinàptics. Aquesta tècnica permetria evaluar si la interacció entre molècules NCAM2 és necessària per a la formació de les sinapsis (Feinberg et al., 2008). A més, els estudis realitzats *in vitro* es podrien completar amb l'anàlisi de la densitat de connexions sinàptiques en diferents temps, concretament, a diferents dies postnatals. L'avenç de les tècniques d'imatge actuals fins i tot permetria poder caracteritzar la formació de les connexions en viu en animals amb una expressió alterada de la proteïna. A més, anàlisis proteòmiques dels compartiments sinàptics ajudarien a determinar la presència de NCAM2 en aquestes regions i visualitzar les proteïnes amb les quals interacciona de manera més específica.

2.3 NCAM2 en la regulació la plasticitat sinàptica

Durant l'etapa adulta, després del procés de maduració i refinament de les sinapsis que té lloc en la infància i adolescència, es manté la regulació de les connexions. Els mecanismes de plasticitat sinàptica permeten modificar les forces de les connexions sinàptiques en resposta a l'activitat, ajudant als circuits a adaptar-se als canvis de l'entorn. També s'ha descrit que en aquesta etapa continua la formació i l'eliminació de sinapsis, tot i que en percentatges molt menors (Südhof, 2021). El remodelatge dels compartiments sinàptics en resposta a l'activitat està dirigit i controlat per les CAMs. Els estudis realitzats en l'àmbit de la plasticitat sinàptica han mostrat que el silenciament de NCAM2 en les neurones granulars del gir dentat de ratolins adults afecta la densitat d'espines dendrítiques (**Figura 4.2**). Aquests fets podrien ser deguts a problemes en la formació de les sinapsis en les neurones generades *de novo* en el gir, durant la neurogènesi adulta, per mitjà dels mecanismes prèviament comentats. L'explicació més probable, però, és que NCAM2 reguli la plasticitat sinàptica de les espines durant l'etapa adulta. Les CAMs exerceixen un ampli ventall de funcions durant els esdeveniments de LTP i LTP. Les cadherines i membres de la superfamília de les Igs (NCAM1 i L1CAM) participen en la inducció de la LTP. A més, les CAMs poden modificar l'alliberament de neurotransmissors en resposta a la LTP (Missler et al., 2012), modificar les propietats dels receptors de neurotransmissors o bé canviar la mida de la zona activa i la densitat postsinàptica (Benson et al., 2000). En molts casos, les CAMs actuen regulant la densitat, la mida i la morfologia de les espines dendrítiques (Missler et al., 2012; Südhof, 2018). Aquests canvis són possibles gràcies a les interaccions de les CAMs amb proteïnes de la densitat postsinàptica i el citoesquelet d'actina que promouen la reestructuració de les espines dendrítiques.

Per tal d'analitzar amb més detall com els canvis d'expressió de NCAM2 afecten a la dinàmica de les espines dendrítiques de les dendrites de la CA1, es van realitzar tècniques d'imatge en viu amb cultius organotípics d'hipocamp. Els cultius organotípics són transfectats biolistícament modificant l'expressió del gen durant set dies. En aquest interval més curt de temps, no vam observar canvis significatius en la densitat d'espines dendrítiques en les neurones on es va silenciar o sobreexpressar NCAM2. En canvi, si que vam poder percebre canvis en l'àrea d'aquestes espines. El silenciament de la proteïna provoca una constricció en l'àrea de les espines. Contràriament, la sobreexpressió de la isoforma NCAM2.1 provoca el engruiximent. Aquests canvis en intervals curts de temps es podrien traduir en canvis en la densitat d'espines si es prolongués la modificació de l'expressió del gen. Per exemple, en el cas del silenciament, la constricció de les espines podria ser un pas previ a la seva pèrdua, tal com s'observa en cultius neuronals i en models in vivo quan el silenciament es manté durant períodes més prolongats. Una major expressió de la proteïna en la membrana de les cèl·lules pot contribuir a estabilitzar els contactes i engrandir l'àrea de l'espina dendrítica (Figura 4.2). En relació amb la mobilitat de l'espina, malgrat no hi diferències signifitives entre condicions, en les nostres condicions experimentals vam poder detectar que tant el silenciament com la sobreexpressió de la isoforma NCAM2.1 tendeixen a augmentar la motilitat de les espines. Noves aproximacions metodològiques seran necessàries per captar aquests canvis subtils amb major precisió, però una motilitat major de les espines podria explicar els canvis observats en la seva àrea. A més, cal puntualitzar que, per motius tècnics, els estudis en cultius organotípics han estat realitzats en dendrites de neurones de la CA1. La disposició d'aquestes cèl·lules en el cultiu organotípic permet una millor visualització de les espines en comparació amb les neurones del gir dentat. Seria interessant doncs, completar els estudis realitzats in vivo amb injeccions de virus a la CA1 i la CA3 de l'hipocamp per comprovar que l'efecte de NCAM2 a les sinapsis no està restringit només al gir dentat.

Les funcions reguladores de NCAM2 en les espines dendrítiques es podrien donar a través de diferents mecanismes. El mecanisme d'acció més problable de la proteïna és la interacció amb elements del citoesquelet. Com hem pogut observar, NCAM2 interacciona amb el citoesquelet d'actina i amb proteïnes reguladores del citoesquelet en etapes postnatals. És probable que aquesta interacció continuï en etapes posteriors i permeti a NCAM2 controlar la dinàmica de la xarxa d'actina. D'aquesta manera, en resposta a l'activitat, NCAM2 podria modificar el citoesquelet d'actina de manera directa o indirecta, i controlar la morfologia de les espines. A banda de regular el citoesquelet d'actina, NCAM2 podria realitzar les seves funcions a través de la interacció amb proteïnes com la CaMKII, una proteïna clau en plasticitat sinàptica, amb la qual interaccionen altres CAMs (Murphy et al., 2023; Sytnyk et al., 2006). A partir de la CaMKII, NCAM2 podria modificar el tràfic de receptors o l'expressió gènica (Yasuda et al., 2022). De fet, NCAM2 també podria participar en els mecanismes de plasticitat sinàptica regulant de manera directa la traducció local de proteïnes. La traducció local de proteïnes en l'espina dendrítica és important per poder respondre als esdeveniments de la plasticitat a llarg termini (Sun et al., 2021). Alguns factors d'elongació de la traducció com l'eEf1A2 poden controlar la plasticitat sinàptica de les espines (Mendoza et al., 2021). En l'anàlisi proteòmica, hem observat la interacció de NCAM2 amb dos factors d'elongació: l'eEF1B i l'eEF1D. Una hipòtesi podria ser que a través d'aquests factors NCAM2 regulés la traducció local i promogués el remodelatge de les espines. Donat que l'anàlisi proteòmica ha estat realitzada en el conjunt de cèl·lules del còrtex i l'hipocamp, podria ser que les interaccions específiques de la proteïna en els compartiments sinàptics no hagin estat detectades. Per això, per conèixer amb més profunditat els mecanismes d'acció de NCAM2, podria ser interessant l'obtenció de sinaptosomes de les neurones de l'hipocamp en els quals poder determinar l'interactoma de la proteïna en les sinapsis.

Per últim, caldria analitzar les implicacions funcionals d'aquests canvis en les espines. L'objectiu és ampliar el projecte amb l'anàlisi dels canvis en l'activitat electrofisològica de les cèl·lules en cultiu, provocats per l'augment o disminució de l'expressió de NCAM2. A més, en els sistemes organotípics, es podria visualitzar si la sobreexpressió o el silenciament de NCAM2 modifica els nivells de calci en resposta a l'activitat. En l'aproximació *in vivo*, hem observat que el silenciament de la proteïna disminueix les espines dendrítiques de les neurones granulars. Aquestes neurones formen part del circuit trisinàptic de l'hipocamp, l'acció del qual és bàsica en la formació de la memòria. Les neurones granulars reben les projeccions provinents del còrtex entorrinal i envien els seus axons a la CA3. Una disminució en el nombre d'espines de les cèl·lules granulars podria implicar alteracions en la correcta transmissió dels impulsos nerviosos del circuit i

comportar defectes en la memòria i l'aprenentatge. Així doncs, seria de gran interès poder realitzar estudis de comportament en ratolins *knock-out* de la proteïna, o en ratolins en els quals s'ha silenciat l'expressió de la mateixa en etapes posteriors, per poder determinar si hi ha canvis en aquests processos cognitius.

Capítol 3. El paper de NCAM2 en la neurogènesi adulta

La plasticitat neuronal adulta també engloba la formació de noves neurones que té lloc en les zones neurogèniques del sistema nerviós.

3.1. El microentorn de les cèl·lules mare neuronals adultes

Mentre que les NSCs embrionàries es divideixen ràpidament en finestres temporals curtes per expandir les poblacions cel·lulars i formar les estructures del SNC, les NSCs de l'etapa adulta presenten una baixa taxa de proliferació que permet la seva conservació al llarg dels anys. Això fa que la regulació de les NSCs embrionàries impliqui actors i mecanismes diferents als de les NSCs adultes (Fuentealba et al., 2015; Urbán & Guillemot, 2014). Un dels trets diferencials més destacats entre les NSCs embrionàries i les adultes és l'estat de quiescència en el qual es troben les últimes. En els nínxols neurogènics de la SVZ i de la SGZ, trobem cèl·lules mare en un estat quiescent amb el cicle cel·lular arrestat que s'activen sota determinats estímuls. La regulació de l'estat funcional de les cèl·lules ve determinada en gran part per la zona neurogènica. Els microentorns tenen dues funcions principals: acomodar la població de progenitors, dotant-les dels factors necessaris pel seu manteniment, i integrar tots els senyals extracel·lulars que controlen el seu comportament proliferatiu i la diferenciació de la progènie.

En els darrers anys, nombrosos estudis de transcriptòmica han analitzat l'empremta genètica i l'expressió diferencial de gens en la població de progenitors de les zones neurogèniques (Chaker et al., 2016; Codega et al., 2014; Davnac et al., 2013; Fuentealba et al., 2015; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014; Kalamakis et al., 2019). Una de les conclusions principals extretes d'aquests estudis és la visió de la població de progenitors com una evolució contínua entre diferents estats de multipotència, que va des de cèl·lules mare profundament dormides a progenitors intermedis d'alta capacitat proliferativa. Canvis en l'expressió dels gens permet fer un seguiment de l'evolució i la transformació de les cèl·lules progenitores al llarg del procés. Les cèl·lules mare neuronals quiescents (qNSCs; de quiescent Neural stem cells) presenten una major expressió de gens implicats en l'adhesió entre cèl·lules, l'adhesió a la matriu extracel·lular, la comunicació cel·lular i l'ancoratge al microentorn. Molts d'aquests gens codifiquen per proteïnes de membrana CAMs que permeten detectar i integrar els estímuls extracel·lulars (Morante-Redolat & Porlan, 2019). Durant l'activació de la proliferació i la transició a progenitors intermedis, l'expressió gènica varia disminuint l'expressió dels gens característics de les cèl·lules quiescents tot augmentant l'expressió de gens proliferatius.



Figura. 4.2. El paper de NCAM2 en la regulació de la plasticitat neuronal adulta.

Representació esquemàtica de les implicacions de NCAM2 en el procés de neurogènesi adulta i plasticitat sinàptica. El silenciament de la proteïna (esquema central), expressada tant en les RGCs com en les neurones madures, podria augmentar la proliferació dels IPCs incrementant el nombre de neurones formades. La reducció en la densitat d'espines podria ser deguda a una menor formació de contactes o bé a la constricció i pèrdua d'espines durant l'etapa adulta. La sobreexpressió de la proteïna (esquema inferior), arresta les RGCs en un estadi de progenitor neuronal disminuint la formació de noves neurones. En plasticitat sinàptica, un augment de l'expressió de NCAM2 pot augmentar la mida de les espines. qNSCs: cèl·lula mare neuronal quiescent; aNSCs: cèl·lula mare neuronal activada; IPC: progenitor intermedi. Font: elaboració pròpia.

Específicament, els perfils genètics de les cèl·lules progenitores obtinguts en els estudis de següenciació de cèl·lula única revelen un enriquiment en cadherines, protochaderines, components de la matriu o les molècules NCAM en les qNSCs (Morizur et al., 2018; Shin et al., 2015). Una reducció dels seus nivells d'expressió seria necessària per activar les cèl·lules i induir l'entrada en el cicle cel·lular. En el cas específic de NCAM2, vam poder analitzar les dades recollides en les anàlisis transcriptòmiques conduiïdes per Morizur et al., 2018 i Shin et al., 2015 i comprovar que NCAM2 es trobava entre les proteïnes expressades de manera diferencial en la població de progenitors. Concretament, les dades senvalaven nivells alts de la proteïna NCAM2 en les cèl·lules quiescents que disminueixen a mesura que les cèl·lules s'activen i entren en proliferació. Aquestes signatures moleculars coincideixen amb els resultats extrets de la immunodetecció de NCAM2 en els actors principals del procés neurogènic del gir dentat. Així doncs, la regulació específica dels nivells de síntesi de la proteïna seria necessària per a la correcta evolució dels esdeveniments neurogènics. La principal evidència de la implicació de NCAM2 en la regulació de la neurogènesi adulta són els canvis observats en el curs dels esdeveniments neurogènics quan es sobreexpressa la proteïna. Mentre que el silenciament de NCAM2 en les RGPs del gir dentat de ratolins adults no afecta la formació de noves neurones; la sobreexpressió de NCAM2.1 i NCAM2.2 disminueix el nombre de neurones formades quatre setmanes després de la modulació de l'expressió gènica. Les dades apunten que la sobreexpressió de la proteïna podria arrestar parcialment les cèl·lules en un estat quiescent enrederint el curs normal dels esdeveniments neurogènics, i disminuint la formació de noves neurones. Aquesta hipòtesi està recolzada amb assajos de BrdU in vitro que mostren com les NSCs adherents en cultius on s'ha silenciat NCAM2 tenen una major taxa de proliferació. Tot i així, per tal de detallar els possibles efectes de NCAM2 en la regulació de la quiescència de les NSCs, es podrien utilitzar cultius de NSCs. En els darrers anys, s'han posat a punt cultius per modelar la quiescència de les NSCs in vitro. L'addició del factor BMP4 als cultius induiex la quiescència dels mateixos, un cop induïda la quiescència, es podria investigar si el silenciament de la proteïna contribueix a l'activació i l'entrada al cicle cel·lular de les cèl·lules (Urbán et al., 2019).

En la regulació de la quiescència i la proliferació de les NSCs hi participen altres CAMs. La VCAM1 és expressada per les NSCs i controla la seva quiescència. Si es bloqueja la seva funció, es desarticula l'estructura de la zona neurogènica, s'altera la citoarquitectura de les cèl·lules ependimals i augmenta la neurogènesi al bulb olfactiu (Kokovay et al., 2012; Morante-Redolat & Porlan, 2019). En la mateixa línia, la N-cadherina participa en les unions entre les NSCs de la SVZ i la seva proteòlisi activa la proliferació de les NSCs (Porlan et al., 2014). La E-cadherina també afecta a la capacitat d'autorenovació de les NSCs i el bloqueig de la integrina

β1 resulta en la disrupció de la zona ventricular i en un augment de la proliferació dels progenitors intermedis (Kazanis et al., 2010). Part dels estudis realitzats per avaluar l'efecte de les CAMs en la neurogènesi adulta han estat realitzats en la SVZ. Davant dels prometedors resultats obtinguts en el la SGZ s'obre un nou interrogant sobre el paper de NCAM2 en la regulació de la SVZ. Des de les etapes finals del desenvolupament trobem expressió de la proteïna en aquesta regió, de manera que NCAM2 podria regular la proliferació dels progenitors de la zona. A més, s'ha descrit que NCAM2 participa en la migració de les interneurones de la SVZ cap al bulb olfactiu a través de la corrent migratòria rostral. Considerant totes aquestes dades, seria interessant avaluar l'efecte del silenciament o la sobreexpressió de la proteïna en els progenitors de la SVZ en la neurogènesi adulta.

A més de regular la proliferació de les NSCs, NCAM2 podria modificar l'especificació del destí cel·lular dels progenitors, alterant la diferenciació de les neurones. Les proteïnes L1CAM i NCAM1 promouen la diferenciació neuronal dels progenitors durant el procés de neurogènesi adulta. L'anàlisi del procés de diferenciació *in vitro* amb NSCs cultivades en forma de neuroesfera i diferenciades en cultius adherents revela un menor percentatge de neurones MAP2 positives quan NCAM2 és regulada a l'alça. En el cas del silenciament de la proteïna, però, no s'observen diferències en comparació amb els controls. Malgrat els canvis observats en el cas de la sobreexpressió podrien segur deguts a la diferenciació de les cèl·lules cap a altres tipus cel·lulars, l'explicació més probable tenint en compte les dades *in vivo* és que NCAM2 afecti a la proliferació de les NSCs en cultiu endarerint la diferenciació i la maduració de les neurones formades.

3.2. Els mecanismes moleculars de NCAM2 en la regulació de la neurogènesi adulta

Els mecanismes exactes que vehiculen la regulació de la quiescència i l'activació de les RGCs per part de NCAM2 hauran de ser investigats en amb major profunditat, però podrien englobar diferents processos. D'entrada, NCAM2 podria regular la proliferació de les RGCs a través del manteniment de l'estructura del nínxol neurogènic i l'adhesió de les cèl·lules amb l'entorn i les cèl·lules veïnes. Diferents estímuls extracel·lulars poden regular de manera dinàmica l'adhesió en el nínxol neurogènic. Per exemple, la proteòlisi de les CAMs permet reclutar les NSCs segons demanada i activar la seva proliferació. Aquest seria el cas de la N-cadherina que pot ser proteolitzada per l'enzim MT5-MMP fet que provoca l'activació de la proliferació de les NSCs de la SVZ tant en condicions fisiològiques com regeneratives després de lesions (Porlan et al., 2014). La inactivació de la Ncadherina no només incrementa la proliferació, sinó que provoca el desmantellament del nínxol neurogènic. En aquesta línia, s'ha descrit que l'enzim BACE-1, regulador de la proliferació neuronal i la diferenciació de les cèl·lules en l'hipocamp adult (Chatila et al., 2018), pot induir la proteòlisi de NCAM2 (Keable et al., 2022). La protèolisi de NCAM2 per part de l'enzim promou l'endocitosi de BACE-1, disminueix els seus nivells en la membrana cel·lular i regula la seva activitat.

NCAM2 també podria regular la quiescència o activació de les NSCs a partir de la interacció amb altres molècules de membrana com els receptors de factors de creixement. En el cas de la N-cadherina, el receptor EGFR indueix la protèolisi de la proteïna i això condueix a una activació de la proliferació (Klingener et al., 2014). En les NSCs embrionàries de la medul·la espinal, NCAM2 controla la proliferació de les cèl·lules cultivades com a neuroesferes per mitjà de l'acció del receptor d'EGF. Les neuroesferes de ratolins que no expressen la proteïna presenten majors nivells d'EGFR i la seva variant fosforil·lada que es tradueixen en una major taxa de proliferació de les cèl·lules (Deleyrolle et al., 2015). La regulació del receptor d'EGF per part d'algunes CAMs es dona per interaccions directes com en el cas de NCAM1, L1CAM o la proteïna ortòloga en invertebrats Fas2 (Ditlevsen et al., 2008.; Mao i Freeman, 2009; Islam et al., 2012). La interacció directe entre NCAM2 i EGFR no ha pogut ser establerta (Deleyrolle et al., 2015), però es creu que NCAM2 podria regular la senvalització per EGFR a través de la degradació del receptor per ubiquitina lligases (Deleyrolle et al., 2015). En canvi, en el cas del receptor FGFR sí que s'ha comprovat la interacció molecular amb NCAM2 proposant un altre mecanisme per la regulació de la divisió de les NSCs (Kim Krighaar Rasmussen et al., 2018). De fet, la seva homòloga NCAM1, pot regular processos com la proliferació cel·lular i la migració a través del mateix receptor (Francavilla et al., 2009). Per poder determinar amb major exactitud els mecanismes moleculars implicats en l'acció de NCAM2 podria ser de gran utilitat analitzar els canvis d'expressió de gens en els progenitors després de modificar l'expressió de NCAM2.

Un darrer mecanisme podria ser la regulació del citoesquelet. La progressió del cicle cel·lular està regulada pel citoesquelet. La interacció de molècules com NCAM1 amb proteïnes del citoesquelet d'actina o proteïnes d'unió al citoesquelet com la profilina afecta la proliferació de les NSCs, modificant la morfologia de les cèl·lules i la formació del fus mitòtic (Huang et al., 2020). NCAM2 interacciona amb l'actina i proteïnes d'unió a aquesta que podrien afavorir la regulació de la proliferació de les NSCs.

Capítol 4. NCAM2 en els desordres neurològics

Els apartats anteriors discuteixen la rellevància de les funcions de NCAM2 en múltiples processos claus per a la formació i el manteniment de la sofisticada xarxa de connexions neuronals que fa possible l'execució de tasques bàsiques i funcions cognitives superiors. Anomalies en el gen i en l'expressió de NCAM2 poden tenir un gran impacte en el correcte desenvolupament d'aquests esdeveniments. No resulta sorprenent, doncs, que la proteïna hagi estat relacionada amb diferents patologies del neurodesenvolupament, desordres neuropsiquiàtrics i malalties neurodegeneratives. Entre les patologies més vinculades amb el gen *Ncam2* hi trobem els trastorns de l'espectre autista (ASD; d'*Autism spectrum disorder*), la síndrome de Down o la malaltia d'Alzheimer (Kimura et al., 2007; Leshchyns'Ka et al., 2015; Molloy et al., 2005; Petit et al., 2015; Scholz et al., 2016).

4.1. Trastorns de l'espectre autista

Els ASD són un grup de desordres del neurodesenvolupament que es caracteritzen per la combinació de problemes en les interaccions socials i comportaments repetitius en els individus que els pateixen (Lord et al., 2018). Entre els més del 100 gens que representen un factor de risc per l'autisme hi trobem Ncam2. S'han detectat delecions i SNPs en el gen Ncam2 en pacients amb ASD (Hussman et al., 2011; Molloy et al., 2005; Scholz et al., 2016). Els individus amb ASD presenten una connectivitat alterada (Bourgeron, 2015). Malgrat hi ha molta variabilitat fenotípica, en molts casos s'observen modificacions en el nombre i la morfologia de les espines (Barón-Mendoza et al., 2021). Alguns estudis apunten a un major nombre d'espines dendrítiques (Tang et al., 2014) deguts a defectes en el refinament de les espines. El mecanisme seria contrari a l'observat en pacients amb esquizofrènia en els quals un excés d'eliminació de les espines provoca dèficits en la connectivitat de les xarxes (Li et al., 2022). Altres estudis apunten a canvis en la morfologia de les cèl·lules i a una major presència de dendrites immadures (Barón-Mendoza et al., 2021). Molts dels gens relacionats amb el trastorn codifiquen per proteïnes d'adhesió sinàptiques i altres components de les sinapsis. Els nostres resultats en el camp de la sinaptogènesi i la plasticitat sinàptica mostren com NCAM2 pot regular la formació i manteniment de les espines, així com modificar la seva àrea. Les modificacions en el gen Ncam2 associades a l'ASD podrien provocar canvis conformacionals i funcionals en la proteïna que afectessin a la formació, maduració i estabilització de les espines. Per exemple, es podrien provocar canvis en la formació dels contactes entre compartiments sinàptiques que modifiquessin la naturalesa de l'adhesió entre ells i afectessin al refinament de les espines.







Figura 4.3. Implicació de NCAM2 en els ASD, la síndrome de Down i la malaltia d'Alzheimer

L'esquema mostra les alteracions en el gen *Ncam2* detectades en els ASD, la síndrome de Down i la malaltia d'Alzheimer (panells esquerra) i els possibles mecanismes d'acció d'aquesta proteïna en el desenvolupament de les malalties (panells drets). ASD: Trastorns de l'Espectre Autista. Font: elaboració pròpia.

4.2. Síndrome de Down

La síndrome de Down és una malaltia del neurodesenvolupament causada per la trisomia del cromosoma 21. Els pacients amb síndrome de Down presenten un retard en el desenvolupament, dèficits en l'aprenentatge i problemes de memòria, entre altres símptomes (Antonarakis et al., 2020; Windsperger i Hoehl, 2021), i són més propensos a desenvolupar desordres com la malaltia d'Alzheimer.

Els mecanismes moleculars radiquen en la trisomia del cromosoma 21 i el canvi en l'equilibri de dosi provocat per la còpia extra d'un cromosoma (en anglès genedosage effect) (Antonarakis et al., 2020). Per aquest motiu, degut a la seva localització en el cromosoma 21, el gen Ncam2 ha estat proposat com un dels gens implicats en els mecanismes moleculars de la malaltia. Malgrat es troba fora de la regió crítica, una còpia extra del cromosoma 21 provoca nivells més elevats de la proteïna durant el desenvolupament i l'etapa adulta (Scholz et al., 2016). De fet, algunes de les marques patofisiològiques de la DS com les alteracions sinàptiques o els defectes en la neurogènesi adulta es correlacionen amb els canvis observats quan NCAM2 és sobreexpressada (Lorenzi & Reeves, 2006). En models murins de la malaltia, s'observa una menor proliferació dels progenitors adults del gir dentat i una menor formació de noves neurones. Aquests resultats coincideixen amb el fenotip observat quan NCAM2 es sobreexpressada. D'aquesta manera, els nivells més alts de NCAM2 deguts a la trisomia del 21 podrien afectar a la regulació de les RGCs dels ratolins model de la malaltia, i modificar la seva divisió. A banda, en els individus amb síndrome de Down també s'observa un creixement aberrant de les dendrites i errors en la transmissió sinàptica, deguts a un excés d'inhibició de la transmissió i canvis en la morfologia de les espines. Totes aquestes alteracions són compatibles amb les funcions descobertes de NCAM2. En consequència, podria ser interessant determinar l'expressió i les afectacions en els mecanismes moleculars de NCAM2 en models animals de la síndrome de Down per veure fins a quin punt la proteïna participa en les alteracions neurogèniques del desordre.

4.3. Malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer és una de les malalties neurodegeneratives més prevalents avui dia. Els pacients que la pateixen presenten pèrdua progressiva de la memòria, alteracions cognitives, errors en la parla i també problemes en el processament de la informació visual, espacial i les tasques executives. Entre els factors de risc de la malaltia hi ha l'expressió de diferents gens, entre ells, *Ncam2*. En la població del Japó, s'han descrit SNPs en el gen *Ncam2* com a factor de risc per la progressió de la malaltia (Kimura et al., 2007). En la mateixa línia, estudis d'associació del genoma (GWAS, de *Genome-Wide Association Studies*) han trobat una relació entre SNPs de *Ncam2* i els nivells del pèptid β-amiloide en el líquid cerebrospinal (Han et al., 2010). Una de les característiques de les primeres etapes de la malaltia d'Alzheimer és la pèrdua de sinapsis (Subramanian et al., 2020). Els nostres resultats en el marc de la plasticitat sinàptica mostren com el silenciament de NCAM2 provoca una constricció de les espines dendrítiques i una pèrdua de sinapsis. Aquests resultats concorden amb estudis previs (Leshchyns'Ka et al., 2015) en els quals es va determinar que el β -amiloide indueix la proteòlisi de NCAM2 dels compartiments sinàptics, fet que comporta una desestabilització i pèrdua de les connexions. NCAM2 podria, doncs, explicar en part la pèrdua de sinapsis vinculada a la malaltia d'Alzheimer i ajudar a comprendre els mecanismes patològics inicials del trastorn. Les cèl·lules humanes pluripotents induïdes (hiPSCs; de human induced pluripotent stem cells) derivades d'individus control i pacients amb la malaltia podrien ser una eina útil per aprofundir en la implicació funcional de NCAM2 en la malaltia. De fet, les hiPSCs s'utilitzen per estudiar el procés de formació de connexions sinàptiques (Südhof, 2018) en l'humà. D'entrada, es podria analitzar l'expressió de NCAM2 en les hiPSCs derivades de pacients per determinar si presenten canvis o polimorfismes en el gen. A partir dels cultius, es podria avaluar l'impacte d'aquests canvis en la formació i el manteniment de les sinapsis. A més, a través d'eines com CRISPR, es podrien reparar les alteracions gèniques i analitzar si es recupera la correcta funció sinàptica.

En conclusió, els descobriments recollits en aquesta tesi posen en valor el paper de la proteïna NCAM2 en processos clau pel correcte desenvolupament del sistema nerviós i la preservació de les seves funcions al llarg de la vida de l'organisme. Les dades recollides en aquestes pàgines contribueixen a ressaltar el rol de les molècules d'adhesió cel·lular en la construcció de la complexa xarxa neuronal del cervell. La gran diversitat de CAMs, entre les quals NCAM2 guanya protagonisme, orquestren múltiples processos cel·lulars i dirigeixen complexes vies de senyalització essencials per al funcionament de processos cognitius tant rellevants com el pensament, el llenguatge o l'aprenentatge. Aquests processos es troben afectats en diverses patologies que presenten alteracions en el gen de *Ncam2*. Així doncs, les dades recollides en aquesta tesi podrien contribuir a entendre els mecanismes de malalties neurològiques com l'Alzheimer i obrir noves vies d'investigació que millorin el nostre coneixement sobre elles.



Les dades recollides en aquesta tesi han permès concloure:

- 1. NCAM2 regula l'establiment de la polaritat neuronal i la formació dels compartiments axo-dendrítics. El silenciament de la proteïna provoca un fenotip dendrític aberrant i canvis en la llargada i ramificació dels axons.
- 2. NCAM2 interacciona amb proteïnes del citoesquelet, proteïnes associades al citoesquelet i molècules senyal com la CaMKII o la 14-3-3 que regulen la morfogènesi i la migració neuronal.
- 3. La sobreexpressió de la CaMKIIβ rescata parcialment el fenotip dendrític aberrant originat pel silenciament de la proteïna NCAM2.
- 4. La proteïna NCAM2 presenta una expressió diferencial entre les cèl·lules implicades en el procés de neurogènesi adulta en la SGZ. Mentre que els progenitors de tipus I i les neurones madures expressen alts nivells de NCAM2, els progenitors intermedis i les neurones immadures presenten nivells més reduïts.
- 5. La sobreexpressió de la proteïna NCAM2 manté les cèl·lules mare neuronals en un estat de progenitor i disminueix la formació de noves neurones en el gir dentat.
- 6. El silenciament de la proteïna NCAM2 en cultius de NSCs provoca un augment de la proliferació de les NSCs.
- 7. La sobreexpressió de la proteïna disminueix el percentatge de neurones MAP2 positives en les cèl·lules en diferenciació. El silenciament no provoca alteracions en el procés de diferenciació de les neurones.
- 8. NCAM2 colocalitza amb marcadors dels compartiments pre i postsinàptics on regula els fenòmens de plasticitat postsinàptica a través de la dinàmica de les espines dendrítiques. El silenciament de NCAM2 provoca una disminució de la densitat d'espines dendrítiques in vitro, mentre que la sobreexpressió de la proteïna no provoca canvis en el nombre d'espines.
- 9. En models *in vivo*, el silenciament de la proteïna disminueix la densitat d'espines dendrítiques de les neurones granulars del gir dentat.
- 10. Les modificacions en els nivells d'expressió de NCAM2 en cultius organotípics afecten a l'àrea de les espines dendrítiques, però no a la seva motilitat. El silenciament disminueix l'àrea de les espines, mentre que la sobreexpressió de la isoforma NCAM2.1 l'augmenta.


- Agirman, G., Broix, L., & Nguyen, L. (2017). Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Letters*, *591*(24), 3978–3992. 10.1002/1873-3468.12924
- Agustín-Durán, D., Mateos-White, I. ., Fabra-Beser, J. ., & Gil-Sanz, C. (2021). Stick around: Cell – Cell Adhesion Molecules during. *Cells*, 10(118). 10.3390/cells10010118
- Akter, M., Kaneko, N., & Sawamoto, K. (2021). Neurogenesis and neuronal migration in the postnatal ventricular-subventricular zone: Similarities and dissimilarities between rodents and primates. *Neuroscience Research*, 167, 64– 69. 10.1016/j.neures.2020.06.001
- Alenius, M., & Bohm, S. (1997). Identification of a novel neural cell adhesion molecule-related gene with a potential role in selective axonal projection. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26083–26086. 10.1074/jbc.272.42.26083
- Alenius, M., & Bohm, S. (2003). Differential function of RNCAM isoforms in precise target selection of olfactory sensory neurons. *Development (Cambridge, England)*, 130(5), 917–927. 10.1242/dev.00317
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, *135*(3509), 1127–1128. 10.1126/science.135.3509.1127
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Post-natal origin of microneurones in the rat brain. Nature, 207(5000), 953–956. 10.1038/207953a0
- Alvarez-Buylla, A., & García-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, 22 (3), 629–634. 10.1523/jneurosci.22-03-00629.2002
- Angata, K., Huckaby, V., Ranscht, B., Terskikh, A., Marth, J. D., & Fukuda, M. (2007). Polysialic Acid-Directed Migration and Differentiation of Neural Precursors Are Essential for Mouse Brain Development. *Molecular and Cellular Biology*, 27(19), 6659–6668. 10.1128/mcb.00205-07
- Antonarakis, S. E., Skotko, B. G., Rafii, M. S., Strydom, A., Pape, S. E., Bianchi, D. W., Sherman, S. L., & Reeves, R. H. (2020). Down syndrome. *Nature Reviews Disease Primers 2020 6:1*, 6(1), 1–20. 10.1038/s41572-019-0143-7
- Arai, Y., & Taverna, E. (2017). Neural progenitor cell polarity and cortical development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 282337. 10.3389/fncel.2017.00384
- Arikkath, J. (2012). Molecular mechanisms of dendrite morphogenesis. Frontiers in Cellular Neuroscience, 6, 1–14. 10.3389/fncel.2012.00061
- Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience 2007 8:3*, 8(3), 194– doi.org/10.1038/nrn2056

- Attardo, A., Calegari, F., Haubensak, W., Wilsch-Bräuninger, M., & Huttner, W.
 B. (2008). Live Imaging at the Onset of Cortical Neurogenesis Reveals Differential Appearance of the Neuronal Phenotype in Apical versus Basal Progenitor Progeny. *PLOS ONE*, 3(6), e2388. 10.1371/journal.pone.0002388
- Auger, M. L. (2020). A novel mechanism underlying activity-dependent pruning in postnatal prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 40(10), 2186–2188. 10.1523/jneurosci.2394-19.2020
- Barnes, A. P., & Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. In *Annual Review of Neuroscience*, 36, 347–381. Annu Rev Neurosci. 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125536
- Barón-Mendoza, I., Maqueda-Martínez, E., Martínez-Marcial, M., De la Fuente-Granada, M., Gómez-Chavarin, M., & González-Arenas, A. (2021). Changes in the Number and Morphology of Dendritic Spines in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of the C58/J Mouse Model of Autism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 1–16. 10.3389/fncel.2021.726501
- Basak, O., Krieger, T. G., Muraro, M. J., Wiebrands, K., Stange, D. E., Frias-Aldeguer, J., Rivron, N. C., van de Wetering, M., van Es, J. H., van Oudenaarden, A., Simons, B. D., & Clevers, H. (2018). Troy+ brain stem cells cycle through quiescence and regulate their number by sensing niche occupancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(4), 610–619. 10.1073/pnas.1715911114
- Bedogni, F., & Hevner, R. F. (2021). Cell-Type-Specific Gene Expression in Developing Mouse Neocortex: Intermediate Progenitors Implicated in Axon Development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 1–24. 10.3389/fnmol.2021.686034
- Bélanger, D., Farah, C. A., Nguyen, M. D., Lauzon, M., & Cornibert, S. (2002). The projection domain of MAP2b regulates microtubule protrusion and process formation in Sf9 cells. *Journal of Cell Science*, 115, 1523-153910.1242/jcs.115.7.1523
- Belvindrah, R., Hankel, S., Walker, J., Patton, B. L., & Müller, U. (2007). B1 Integrins Control the Formation of Cell Chains in the Adult Rostral Migratory Stream. *Journal of Neuroscience*, 27(10), 2704–2717. 10.1523/jneurosci.2991-06.2007
- Benson, D. L., Schnapp, L. M., Shapiro, L., & Huntley, G. W. (2000). Making memories stick: Cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends in Cell Biology*, 10(11), 473–482. 10.1016/S0962-8924(00)01838-9
- Bentley, M., & Banker, G. (2016). The cellular mechanisms that maintain neuronal polarity. Nature Reviews Neuroscience 2016 17:10, 17(10), 611–622. 10.1038/nrn.2016.100

- Berg, D. A., Belnoue, L., Song, H., & Simon, A. (2013). Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. 2561, 2548–2561. https://doi.org/10.1242/dev.088005
- Berg, D. A., Bond, A. M., Ming, G., & Song, H. (2018). Radial glial cells in the adult dentate gyrus: what are they and where do they come from? *F1000Research*, 7. 10.12688/f1000research.12684.1
- Bian, S. (2013). Cell Adhesion Molecules in Neural Stem Cell and Stem Cell-Based Therapy for Neural Disorders. Neural Stem Cells - New Perspectives. 10.5772/55136
- Bian, W., Miao, W., He, S., Qiu, Z., & Yu, X. (2015). Coordinated Spine Pruning and Maturation Mediated by Inter-Spine Competition for Cadherin/Catenin Complexes. *Cell*, 162(4), 808–822. 10.1016/j.cell.2015.07.018
- Bjornsson, C. S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., & Temple, S. (2015). It Takes a Village: Constructing the Neurogenic Niche. *Developmental Cell*, 32(4), 435. 10.1016/j.devcel.2015.01.010
- Blackledge, M., & Žídek, L. (2019). Structure and Functions of Microtubule Associated Proteins Tau and MAP2c: Similarities and Differences. 1–32. 10.3390/biom9030105
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G. B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A. J., Hen, R., & Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, 22(4), 589-599.e5. 10.1016/j.stem.2018.03.015
- Bonafina, A., Paratcha, G., & Ledda, F. (2020). Deciphering New Players in the Neurogenic Adult Hippocampal Niche. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8, 548. 10.3389/fcell.2020.00548
- Bond, A. M., Ming, G., & Song, H. (2022). What Is the Relationship Between Hippocampal Neurogenesis Across Different Stages of the Lifespan? *Frontiers in Neuroscience, 16.* 10.3389/fnins.2022.891713
- Bonfanti, L., & Seki, T. (2021). The psa-ncam-positive "immature" neurons: An old discovery providing new vistas on brain structural plasticity. *Cells*, *10*(10). 10.3390/cells10102542
- Borisovska, M., McGinley, M. J., Bensen, A., & Westbrook, G. L. (2011). Loss of olfactory cell adhesion molecule reduces the synchrony of mitral cell activity in olfactory glomeruli. *The Journal of Physiology*, 589(8), 1927–1941. doi.org/10.1113/jphysiol.2011.206276
- Borrell, V., & Reillo, I. (2012). Emerging roles of neural stem cells in cerebral cortex development and evolution. *Developmental Neurobiology*, 72(7), 955– doi.org/10.1002/dneu.22013

- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82(2), 444–459. /j.neuron.2014.03.021
- Bosch, M., & Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 383. 10.1016/j.conb.2011.09.002
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(9), 551–563. 10.1038/nrn3992
- Boutin, C., Schmitz, B., Cremer, H., & Diestel, S. (2009). NCAM expression induces neurogenesis in vivo. *European Journal of Neuroscience*, 30(7), 1209– 1218. 10.1111/j.1460-9568.2009.06928.x
- Bressan, C., & Saghatelyan, A. (2021). Intrinsic Mechanisms Regulating Neuronal Migration in the Postnatal Brain. Frontiers in Cellular Neuroscience, 14, 1–19. 10.3389/fncel.2020.620379
- Buchsbaum, I. Y., & Cappello, S. (2019). Neuronal migration in the SNC during development and disease: Insights from in vivo and in vitro models. *Development*, 146(1). 10.1242/dev.163766
- Burute, M., Jansen, K. I., Mihajlovic, M., Vermonden, T., & Kapitein, L. C. (2022). Local changes in microtubule network mobility instruct neuronal polarization and axon specification. *Science Advances*, 8(44), 1–12. 10.1126/sciadv.abo2343
- Cane, M., Maco, B., Knott, G., & Holtmaat, A. (2014). The Relationship between PSD-95 Clustering and Spine Stability In Vivo. *The Journal of Neuroscience*, 34(6), 2075–2086. 10.1523/jneurosci.3353-13.2014
- Castillo, P. E., Purpura, D. P., Sheng, M., Sabatini, B., & Sü, T. (2012). Presynaptic LTP and LTD of Excitatory and Inhibitory Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(2), a005728. 10.1101/cshperspect.a005728
- Causeret, F., Moreau, M. X., Pierani, A., & Blanquie, O. (2021). The multiple facets of Cajal-Retzius neurons. *Development*, 148(11). 10.1242/dev.199409
- Chaker, Z., Codega, P., & Doetsch, F. (2016). A mosaic world : puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity, *Developmental Biology*, 5. 10.1002/wdev.248
- Charvet, C. J., Finlay, B. L., & Finlay, B. L. (2018). Comparing Adult Hippocampal Neurogenesis Across Species: Translating Time to Predict the Tempo in Humans. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 10.3389/fnins.2018.00706

- Chatila, Z. K., Kim, E., Berlé, C., Bylykbashi, E., Rompala, A., Oram, M. K., Gupta, D., Kwak, S. S., Kim, Y. H., Kim, D. Y., Choi, S. H., & Tanzi, R. E. (2018). BACE1 Regulates Proliferation and Neuronal Differentiation of Newborn Cells in the Adult Hippocampus in Mice. *ENeuro*, 5(4). 10.1523/eneuro.0067-18.2018
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J., & Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360(6405), 674–677. 10.1038/360674A0
- Chen, S. X., Tari, P. K., She, K., & Haas, K. (2010). Neurexin-neuroligin cell adhesion complexes contribute to synaptotropic dendritogenesis via growth stabilization mechanisms in vivo. *Neuron*, 67(6), 967–983. 10.1016/j.neuron.2010.08.016
- Chernyshova, Y., Leshchyns, I., Hsu, S., 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. 31(10), 3522–3535. 10.1523/jneurosci.3109-10.2011
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C. A., Mullowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D. F., Bornstein, P., & Barres, B. A. (2005).
 Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote SNC synaptogenesis. *Cell*, *120*(3), 421–433. 10.1016/j.cell.2004.12.020
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2007). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18–41. 10.1038/sj.npp.1301559
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A. R., DeLeo, A. M., Pastrana, E., & Doetsch, F. (2014). Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron*, 82(3), 545–559. 10.1016/j.neuron.2014.02.039
- Colgan, L. A., & Yasuda, R. (2014). *Plasticity of Dendritic Spines:* Subcompartmentalization of Signaling. Annu Rev Physiol., 76, 365-385. 10.1146/annurev-physiol-021113-170400.
- Collingridge, G. L., Peineau, S., Howland, J. G., & Wang, Y. T. (2010). Long-term depression in the SNC. *Nature Reviews Neuroscience 2010 11:7*, *11*(7), 459–473. 10.1038/nrn2867
- Cornell, B., & Toyo-oka, K. (2017). 14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis. Frontiers in molecular neuroscience, 10, 318. 10.3389/fnmol.2017.00318
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Scares, H. D., Morgan, J. I., & Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, 374(6524), 719–723. 10.1038/374719A0

- Dalva, M. B., McClelland, A. C., & Kayser, M. S. (2007). Cell adhesion molecules: Signalling functions at the synapse. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(3), 206–220. 10.1038/nrn2075
- Berg, D. A., Su, Y., Jimenez-Cyrus, D., Patel, A., Huang, N., Morizet, D., Lee, S., Shah, R., Ringeling, F. R., Jain, R., Epstein, J. A., Wu, Q. F., Canzar, S., Ming, G. L., Song, H., & Bond, A. M. (2019). A Common Embryonic Origin of Stem Cells Drives Developmental and Adult Neurogenesis. *Cell*, 177(3), 654–668.e15. 10.1016/j.cell.2019.02.010
- Davis, D. A., Wilson, M. H., Giraud, J., Xie, Z., Tseng, H. C., England, C., Herscovitz, H., Tsai, L. H., & Delalle, I. (2009). Capzb2 interacts with βtubulin to regulate growth cone morphology and neurite outgrowth. *PLoS Biology*, 7(10), e1000208–e1000208. 10.1371/journal.pbio.1000208
- Daynac, M., Chicheportiche, A., Pineda, J. R., Gauthier, L. R., Boussin, F. D., & Mouthon, M. (2013). Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABA A R signaling following radiation damage. *Stem Cell Research*, 11(1), 516–528. 10.1016/j.scr.2013.02.008
- Del Río, J. A., Heimrich, B., Borrell, V., Förster, E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M., & Soriano, E. (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*, 385(6611), 70–74. 10.1038/385070a0
- Deleyrolle, L., Sabourin, J. C., Rothhut, B., Fujita, H., Guichet, P. O., Teigell, M., Ripoll, C., Chauvet, N., Perrin, F., Mamaeva, D., Noda, T., Mori, K., Yoshihara, Y., & Hugnot, J. P. (2015). OCAM regulates embryonic spinal cord stem cell proliferation by modulating ErbB2 receptor. *PLoS ONE*, 10(4), e0122337. 10.1371/journal.pone.0122337
- Dennis, C. V., Suh, L. S., Rodriguez, M. L., Kril, J. J., & Sutherland, G. T. (2016). Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42(7), 621–638. 10.1111/nan.12337
- Dent, E., Gupton, S., & Gertler, F. (2011). The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3), 1–39. 10.1101/cshperspect.a001800
- Dent, E. W., Gupton, S. L., & Gertler, F. B. (2011). The growth cone cytoskeleton in Axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3), 1–39. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001800
- Di Bella, D. J., Habibi, E., Stickels, R. R., Scalia, G., Brown, J., Yadollahpour, P., Yang, S. M., Abbate, C., Biancalani, T., Macosko, E. Z., Chen, F., Regev, A., & Arlotta, P. (2021). Molecular logic of cellular diversification in the mouse cerebral cortex. *Nature*, 595(7868), 554–559. 10.1038/s41586-021-03670-5

- Ding, C., Yan, X., Xu, M., Zhou, R., Zhao, Y., Zhang, D., Huang, Z., Pan, Z., Xiao, P., Li, H., Chen, L., & Wang, Y. (2022). Short-read and long-read fulllength transcriptome of mouse neural stem cells across neurodevelopmental stages. *Scientific Data*, 9(1), 1–10. 10.1038/s41597-022-01165-0
- Ditlevsen, D. K., Povlsen, G. K., Berezin, V., & Bock, E. (2008). NCAM-induced intracellular signaling revisited. Journal of neuroscience research, 86(4), 727–743. 10.1002/jnr.21551
- Dityatev, A., Dityateva, G., Sytnyk, V., Delling, M., Toni, N., Nikonenko, I., Muller, D., & Schachner, M. (2004). Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule Promotes Remodeling and Formation of Hippocampal Synapses. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9372–9382. 10.1523/jneurosci.1702-04.2004
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703–716. 10.1016/S0092-8674(00)80783-7
- Dosemeci, A., Weinberg, R. J., Reese, T. S., & Tao-Cheng, J. H. (2016). The postsynaptic density: There is more than meets the eye. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8, 1–8. 10.3389/fnsyn.2016.00023
- Dotti, C. G., & Banker, G. A. (1987). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature*, *330*(6145), 254–256. 10.1038/330254A0
- Dulken, B. W., Leeman, D. S., Boutet, S. C., Hebestreit, K., & Brunet, A. (2017). Single-Cell Transcriptomic Analysis Defines Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in the Adult Neural Stem Cell Lineage. *Cell Reports*, 18(3), 777–790. 10.1016/j.celrep.2016.12.060
- Duncan, B. W., Murphy, K. E., & Maness, P. F. (2021). Molecular Mechanisms of L1 and NCAM Adhesion Molecules in Synaptic Pruning, Plasticity, and Stabilization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. 10.3389/fcell.2021.625340
- Duque, A., Arellano, J. I., & Rakic, P. (2022). An assessment of the existence of adult neurogenesis in humans and value of its rodent models for neuropsychiatric diseases. *Molecular Psychiatry*, 27(1), 377. 10.1038/S41380-021-01314-8
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4(11), 1313–1317. 10.1038/3305
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., & Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156(5), 1072–1083. 10.1016/j.cell.2014.01.044

- Eze, U. C., Bhaduri, A., Haeussler, M., Nowakowski, T. J., & Kriegstein, A. R. (2021). Single-cell atlas of early human brain development highlights heterogeneity of human neuroepithelial cells and early radial glia. *Nature Neuroscience*, 24(4), 584–594. 10.1038/s41593-020-00794-1
- Feinberg, E. H., VanHoven, M. K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R. D., Shen, K., & Bargmann, C. I. (2008). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) Defines Cell Contacts and Synapses in Living Nervous Systems. *Neuron*, 57(3), 353–363. 10.1016/j.neuron.2007.11.030
- Feliciano, D. M., Bordey, A., & Bonfanti, L. (2015). Noncanonical Sites of Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 7(10), a018846. 10.1101/cshperspect.a018846
- Ferent, J., Zaidi, D., & Francis, F. (2020). Extracellular Control of Radial Glia Proliferation and Scaffolding During Cortical Development and Pathology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. 10.3389/fcell.2020.578341
- Florio, M., & Huttner, W. B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development*, 141(11), 2182–2194. 10.1242/dev.090571
- Francavilla, C., Cattaneo, P., Berezin, V., Bock, E., Ami, D., De Marco, A., Christofori, G., & Cavallaro, U. (2009). The binding of NCAM to FGFR1 induces a specific cellular response mediated by receptor trafficking. *Journal* of Cell Biology, 187(7), 1101–1116. 10.1083/jcb.200903030
- Franco, S. J., Gil-Sanz, C., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S. R., Ramos, C., & Müller, U. (2012). Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. *Science*, 337(6095), 746–749. 10.1126/science.1223616
- Franco, S. J., & Müller, U. (2013). Shaping Our Minds: Stem and Progenitor Cell Diversity in the Mammalian Neocortex. *Neuron*, 77(1), 19–34. /j.neuron.2012.12.022
- Frese, C. K., Mikhaylova, M., Stucchi, R., Gautier, V., Liu, Q., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Altelaar, A. F. M., & Hoogenraad, C. C. (2017). Quantitative Map of Proteome Dynamics during Neuronal Differentiation. *Cell Reports*, 18(6), 1527–1542. 10.1016/j.celrep.2017.01.025
- Fuentealba, L. C., Rompani, S. B., Parraguez, J. I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C. L., & Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*, 161(7), 1644–1655. https://doi.org/
- Funahashi, Y., Namba, T., Nakamuta, S., & Kaibuchi, K. (2014). Neuronal polarization in vivo: Growing in a complex environment. *Current Opinion in Neurobiology*, 27, 215–223. 10.1016/j.conb.2014.04.009

- Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K. I., Hirabayashi, Y., & Gotoh, Y. (2015). Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nature neuroscience*, 18(5), 657–665. 10.1038/nn.3989
- Gage, F. H. (2019). Adult neurogenesis in mammals. *Science*, 364(6443). 10.1126/science.aav6885
- Galán, L., Gómez-Pinedo, U., Guerrero, A., García-Verdugo, J. M., & Matías-Guiu, J. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis modifies progenitor neural proliferation in adult classic neurogenic brain niches. *BMC Neurology*, 17(1). 10.1186/S12883-017-0956-5
- Gamarra, M., de la Cruz, A., Blanco-Urrejola, M., & Baleriola, J. (2021). Local Translation in Nervous System Pathologies. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 15, 16. 10.3389/fnint.2021.689208/bibtex
- Gärtner, A., Fornasiero, E. F., & Dotti, C. G. (2012). N-cadherin: a new player in neuronal polarity. *Cell cycle*, 11(12), 2223–2224. 10.4161/cc.20797
- Gärtner, A., Fornasiero, E. F., & Dotti, C. G. (2015). Cadherins as regulators of neuronal polarity. *Cell Adhesion and Migration*, 9(3), 175–182. https://doi.org/10.4161/19336918.2014.983808
- Gascon, E., Vutskits, L., & Kiss, J. Z. (2010). The role of PSA-NCAM in adult neurogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology, 663, 127–136. 10.1007/978-1-4419-1170-4_8/cover
- Gennarini, G., & Furley, A. (2017). Cell adhesion molecules in neural development and disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 81, 1–3. 10.1016/j.mcn.2017.03.010
- Gerrow, K., & El-Husseini, A. (2006). Cell adhesion molecules at the synapse. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 11, Issue SUPPL. 2, pp. 2400–2419). Front Biosci. https://doi.org/10.2741/1978
- Poplawski, G. H., Tranziska, A. K., Leshchyns'ka, I., Meier, I. D., Streichert, T., Sytnyk, V., & Schachner, M. (2012). L1CAM increases MAP2 expression via the MAPK pathway to promote neurite outgrowth. *Molecular and cellular neurosciences*, 50(2), 169–178. 10.1016/j.mcn.2012.03.010
- Gil-Sanz, C., Franco, S. J., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S., & Müller, U. (2013). Cajal-Retzius cells instruct neuronal migration by coincidence signaling between secreted and contact-dependent guidance cues. *Neuron*, 79(3), 461–477. 0.1016/j.neuron.2013.06.040
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, 167(4), 897–914. 10.1016/j.cell.2016.10.021

- González-Billault, C., Del Río, J. A., Ureña, J. M., Jiménez-Mateos, E. M., Barallobre, M. J., Pascual, M., Pujadas, L., Simó, S., Torre, A. La, Gavin, R., Wandosell, F., Soriano, E., & Ávila, J. (2005). A role of MAP1B in Reelindependent Neuronal Migration. *Cerebral Cortex*, 15(8), 1134–1145. 10.1093/cercor/bhh213
- Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(10), 777–788. 10.1038/nrm1739
- Grueber WB, Sagasti A. Self-avoidance and tiling: Mechanisms of dendrite and axon spacing. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Sep;2(9):a001750. doi: 10.1101/cshperspect.a001750. Epub 2010 Jun 23. PMID: 20573716; PMCID: PMC2926746.Gu, X., Jia, C., & Wang, J. (2023). Advances in Understanding the Molecular Mechanisms of Neuronal Polarity. *Molecular Neurobiology*, 60(5). 10.1007/S12035-023-03242-W
- Hamlin, J. A., Fang, H., & Schwob, J. E. (2004). Differential expression of the mammalian homologue of fasciclin II during olfactory development in vivo and in vitro. *Journal of Comparative Neurology*, 474(3), 438–452. 10.1002/cne.20133
- Han, M. R., Schellenberg, G. D., & Wang, L. S. (2010). Genome-wide association reveals genetic effects on human Aβ42and τ protein levels in cerebrospinal fluids: A case control study. *BMC Neurology*, 10. 10.1186/1471-2377-10-90
- Hanashima, C., & Toma, K. (2015). Switching modes in corticogenesis: Mechanisms of neuronal subtype transitions and integration in the cerebral cortex. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 1–18. 10.3389/fnins.2015.00274
- Bao, H., Asrican, B., Li, W., Gu, B., Wen, Z., Lim, S. A., Haniff, I., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Philpot, B., & Song, J. (2017). Long-Range GABAergic Inputs Regulate Neural Stem Cell Quiescence and Control Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell stem cell*, 21(5), 604–617.e5. 10.1016/j.stem.2017.10.003
- Halpain, S., & Dehmelt, L. (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, 7(6). 10.1186/gb-2006-7-6-224
- Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R. L., & Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*, 464(7288), 554–561. 10.1038/nature08845
- Hardingham, N., Dachtler, J., & Fox, K. (2013). The role of nitric oxide in presynaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 1–19. 10.3389/fncel.2013.00190
- Hayashi, K., Kubo, K. I., Kitazawa, A., & Nakajima, K. (2015). Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 1–11. 10.3389/fnins.2015.00135

- Hering, H., & Sheng, M. (2001). Dentritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience 2001 2:12, 2*(12), 880–888. 10.1038/35104061
- Hevner, R. F. (2019). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. Journal of Anatomy, 235(3), 616–625. 10.1111/joa.12939
- Higgs, V. E., & Das, R. M. (2022). Establishing neuronal polarity: microtubule regulation during neurite initiation. Oxford Open Neuroscience, 1, 1–19. 0.1093/oons/kvac007
- Holmes, M. M. (2016). Frontiers in Neuroendocrinology Social regulation of adult neurogenesis : A comparative approach. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 41, 59– 70. 10.1016/j.yfrne.2016.02.001
- Holt, C. E., Martin, K. C., & Schuman, E. M. (2019). Local translation in neurons: visualization and function. *Nature Structural and Molecular Biology*, 26(7), 557– 566. 10.1038/s41594-019-0263-5
- Honig, B., & Shapiro, L. (2020). Adhesion Protein Structure, Molecular Affinities, and Principles of Cell-Cell Recognition. *Cell*, 181(3), 520–535. 10.1016/j.cell.2020.04.010
- Hormuzdi, S. G., Filippov, M. A., Mitropoulou, G., Monyer, H., & Bruzzone, R. (2004). Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -*Biomembranes*, 1662(1–2), 113–137. 10.1016/j.bbamem.2003.10.023
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function. *Journal of Cell Biology*, 189(4), 619–629. T10.1083/jcb.201003008
- Hu, H. (1999). Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron*, 23(4), 703–711. 10.1016/S0896-6273(01)80029-5
- Huang, C. Y. M., & Rasband, M. N. (2018). Axon initial segments: structure, function, and disease. Annals of the New York Academy of Sciences, 1420(1), 46. 10.1111/nyas.13718
- Huang, R., Yuan, D. J., Li, S., Liang, X. S., Gao, Y., Lan, X. Y., Qin, H. M., Ma, Y. F., Xu, G. Y., Schachner, M., Sytnyk, V., Boltze, J., Ma, Q. H., & Li, S. (2020). NCAM regulates temporal specification of neural progenitor cells via profilin2 during corticogenesis. *Journal of Cell Biology*, 219(1). 10.1083/jcb.201902164
- Huang, X., Liu, J., Ketova, T., Fleming, J. T., Grover, V. K., Cooper, M. K., Litingtung, Y., & Chiang, C. (2010). Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(18), 8422– 8427. 10.1073/pnas.0911838107

- Humphries, M. J., Mcewan, P. A., Barton, S. J., Buckley, P. A., Bella, J., & Mould, A. P. (2003). Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends in Biochemical Sciences 28*(6), 10.1016/S0968-0004(03)00112-9
- Hussman, J. P., Chung, R. H., Griswold, A. J., Jaworski, J. M., Salyakina, D., Ma, D., Konidari, I., Whitehead, P. L., Vance, J. M., Martin, E. R., Cuccaro, M. L., Gilbert, J. R., Haines, J. L., & Pericak-Vance, M. A. (2011). A noisereduction GWAS analysis implicates altered regulation of neurite outgrowth and guidance in autism. *Molecular Autism*, 2(1), 1–16. 10.1186/2040-2392-2-1/figures/3
- Huttlin, E. L., Jedrychowski, M. P., Elias, J. E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S. A., Villén, J., Haas, W., Sowa, M. E., & Gygi, S. P. (2010). A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*, 143(7), 1174– 10.1016/j.cell.2010.12.001
- Ichinohe, N., Knight, A., Ogawa, M., Ohshima, T., Mikoshiba, K., Yoshihara, Y., Terashima, T., & Rockland, K. S. (2008). Unusual patch-matrix organization in the retrosplenial cortex of the reeler mouse and Shaking rat Kawasaki. Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991), 18(5), 1125–1138. 10.1093/cercor/bhm148
- Ichinohe, N., Yoshihara, Y., Hashikawa, T., & Rockland, K. S. (2003). Developmental study of dendritic bundles in layer 1 of the rat granular retrosplenial cortex with special reference to a cell adhesion molecule, OCAM. *European Journal of Neuroscience*, 18(7), 1764–1774. 10.1046/j.1460-9568.2003.02900.x
- Ihrie, R. A., & Álvarez-Buylla, A. (2011). Lake-Front Property: A Unique Germinal Niche by the Lateral Ventricles of the Adult Brain. *Neuron*, 70(4), 674–686). 10.1016/j.neuron.2011.05.004
- Islam, R., Kristiansen, L. V., Romani, S., Garcia-Alonso, L., & Hortsch, M. (2004). Activation of EGF receptor kinase by L1-mediated homophilic cell interactions. *Molecular biology of the cell*, 15(4), 2003–2012. 10.1091/mbc.e03-05-0333
- Janke, C., & Bulinski, J. C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(12), 773–786. 10.1038/nrm3227
- Johansson, P. A., Irmler, M., Acampora, D., Beckers, J., Simeone, A., & Götz, M. (2013). The transcription factor Otx2 regulates choroid plexus development and function. *Development*, 140(5), 1055–1066. 10.1242/dev.090860
- Jones, S. L., & Svitkina, T. M. (2016). Axon Initial Segment Cytoskeleton: Architecture, Development, and Role in Neuron Polarity. *Neural Plasticity*, 2016. /10.1155/2016/6808293

- Kahn, O. I., Sharma, V., González-Billault, C., & Baas, P. W. (2015). Effects of kinesin-5 inhibition on dendritic architecture and microtubule organization. *Molecular biology of the cell*, 26(1), 66–77. 10.1091/mbc.E14-08-1313
- Kalamakis, G., Brüne, D., Ravichandran, S., Bolz, J., Fan, W., Ziebell, F., Stiehl, T., Catalá-Martinez, F., Kupke, J., Zhao, S., Llorens-Bobadilla, E., Bauer, K., Limpert, S., Berger, B., Christen, U., Schmezer, P., Mallm, J. P., Berninger, B., Anders, S., Del Sol, A., ... Martin-Villalba, A. (2019). Quiescence Modulates Stem Cell Maintenance and Regenerative Capacity in the Aging Brain. *Cell*, *176*(6), 1407–1419.e14. 10.1016/j.cell.2019.01.040
- Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2015). Review Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron*, 87(3), 492–506. 10.1016/j.neuron.2015.05.046
- Kasahara, K., Watanabe, K., Kozutsumi, Y., Oohira, A., Yamamoto, T., & Sanai, Y. (2002). Association of GPI-Anchored Protein TAG-1 with Src-Family Kinase Lyn in Lipid Rafts of Cerebellar Granule Cells. *Neurochemical Research* 2002 27:7, 27(7), 823–829. 10.1023/A:1020265225916
- Kasahara, K., Watanabe, K., Takeuchi, K., Kaneko, H., Oohira, A., Yamamoto, T., & Sanai, Y. (2000). Involvement of gangliosides in glycosylphosphatidylinositol-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 signaling in lipid rafts. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34701–34709. 10.1074/jbc.m003163200
- Kazanis, I., Lathia, J. D., Vadakkan, T. J., Raborn, E., Wan, R., Mughal, M. R., Eckley, D. M., Sasaki, T., Patton, B., Mattson, M. P., Hirschi, K. K., Dickinson, M. E., & Ffrench-Constant, C. (2010). Quiescence and Activation of Stem and Precursor Cell Populations in the Subependymal Zone of the Mammalian Brain Are Associated with Distinct Cellular and Extracellular Matrix Signals. *The Journal of Neuroscience*, 30(29), 9771. 10.1523/jneurosci.0700-10.2010
- Keable, R., Hu, S., Pfundstein, G., Kozlova, I., Su, F., Du, X., Yang, H., Gunnersen, J., Schachner, M., Leshchyns'ka, I., & Sytnyk, V. (2022). The BACE1-generated C-terminal fragment of the neural cell adhesion molecule 2 (NCAM2) promotes BACE1 targeting to Rab11-positive endosomes. *Cellular and molecular life sciences*, 79(11), 555. 10.1007/s00018-022-04575-w
- Kempermann G. (2015). Activity Dependency and Aging in the Regulation of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(11), a018929. 10.1101/cshperspect.a018929
- Kempermann, G., Gage, F. H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M. A., Thuret, S., Kuhn, H. G., Jessberger, S., Frankland, P. W., Cameron, H. A., Gould, E., & Hen, R. (2018). *Minireview Human Adult Neurogenesis : Evidence and Remaining Questions Minireview*. 25–30. 10.1016/j.stem.2018.04.004

- Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 7(9), a018812. 10.1101/cshperspect.a018812
- Kilinc, D. (2018). The emerging role of mechanics in synapse formation and plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 483. 10.3389/fncel.2018.00483
- Kim, W. H., Watanabe, H., Lomoio, S., & Tesco, G. (2021). Spatiotemporal processing of neural cell adhesion molecules 1 and 2 by BACE1 in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100372. 10.1016/j.jbc.2021.100372
- Kimura, R., Kamino, K., Yamamoto, M., Nuripa, A., Kida, T., Kazui, H., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Yamagata, H., Tabara, Y., Miki, T., Akatsu, H., Kosaka, K., Funakoshi, E., Nishitomi, K., Sakaguchi, G., Kato, A., Hattori, H., Uema, T., ... Takeda, M. (2007). The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Human molecular genetics*, 16(1), 15–23. doi.org/10.1093/hmg/ddl437
- Kirchner, J. H., Lucas, E., & Julijana, G. (2023). Dendritic growth and synaptic organization from activity-independent cues and local activity- dependent plasticity. *ELife*, 12:RP87527, 1–42. 10.7554/eLife.87527.1
- Kiselyov, V. V., Skladchikova, G., Hinsby, A. M., Jensen, P. H., Kulahin, N., Soroka, V., Pedersen, N., Tsetlin, V., Poulsen, F. M., Berezin, V., & Bock, E. (2003). Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure*, *11*(6), 691–701. 10.1016/S0969-2126(03)00096-0
- Kiselyov, V. V., Soroka, V., Berezin, V., & Bock, E. (2005). Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *Journal of Neurochemistry*, 94(5), 1169–1179. 10.1111/j.1471-4159.2005.03284.x
- Klingener, M., Chavali, M., Singh, J., McMillan, N., Coomes, A., Dempsey, P. J., Chen, E. I., & Aguirre, A. (2014). N-Cadherin promotes recruitment and migration of neural progenitor cells from the SVZ neural stem cell niche into demyelinated lesions. *Journal of Neuroscience*, 34(29), 9590–9606. 10.1523/jneurosci.3699-13.2014
- Knoblich, J. A. (2008). Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. Cell, 132(4), 583–597. 10.1016/j.cell.2008.02.007
- Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R. P., Horvat, V., Volk, B., & Kempermann, G. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PloS One*, 5(1). 10.1371/journal.pone.0008809

- Kokovay, E., Wang, Y., Kusek, G., Wurster, R., Lederman, P., Lowry, N., Shen, Q., & Temple, S. (2012). VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell Stem Cell*, 11(2), 220–230. 10.1016/j.stem.2012.06.016
- Konietzny, A., Bär, J., & Mikhaylova, M. (2017). Dendritic actin cytoskeleton: Structure, functions, and regulations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 263976. 10.3389/fncel.2017.00147
- Kosodo, Y., & Huttner, W. B. (2009). Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Development Growth and Differentiation*, 51(3), 251–261. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01101.x
- Kozlova, I., Sah, S., Keable, R., Leshchyns'ka, I., Janitz, M., & Sytnyk, V. (2020). Cell Adhesion Molecules and Protein Synthesis Regulation in Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 208. 10.3389/fnmol.2020.592126
- Kulahin, N., Kristensen, O., Rasmussen, K. K., Olsen, L., Rydberg, P., Vestergaard, B., Kastrup, J. S., Berezin, V., Bock, E., Walmod, P. S., & Gajhede, M. (2011). Structural Model and trans-Interaction of the Entire Ectodomain of the Olfactory Cell Adhesion Molecule. *Structure*, 19(2), 203– 211. 10.1016/j.str.2010.12.014
- Kulahin, N., & Walmod, P. S. (2010). The neural cell adhesion molecule NCAM2/OCAM/RNCAM, a close relative to NCAM. Advances in Experimental Medicine and Biology, 663, 403–420. 10.1007/978-1-4419-1170-4_25
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5), 737–746. 10.1016/j.conb.2012.04.003
- Lazarini, F., & Lledo, P. M. (2011). Is adult neurogenesis essential for olfaction? In *Trends in Neurosciences, 34*(1), 20–30. 10.1016/j.tins.2010.09.006
- Ledda, F., & Paratcha, G. (2017). Mechanisms regulating dendritic arbor patterning. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(24), 4511–4537. 0.1007/s00018-017-2588-8
- Lehtinen, M. K., Zappaterra, M. W., Chen, X., Yang, Y. J., Hill, A., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., Joseph D'ercole, A., Wong, E. T., Lamantia, A. S., & Walsh, C. A. (2011). The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron*, 69(5), 893–905. 10.1016/j.neuron.2011.01.023
- Leshchyns'Ka, I, Liew, H. ., Shepherd, C., Halliday, G. ., Stevens, C. ., Ke, Y. D., Ittner, L. M., & Sytnyk, V. (2015). Aβ-dependent reduction of NCAM2mediated synaptic adhesion contributes to synapse loss in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, *6*, 8836. 10.1038/ncomms9836

- Leshchyns'Ka, Iryna, & Sytnyk, V. (2016). Synaptic Cell Adhesion Molecules in Alzheimer's Disease. *Neural Plasticity*, 2016. 10.1155/2016/6427537
- Leterrier, C. (2018). The axon initial segment: An updated viewpoint. *Journal of Neuroscience*, 38(9), 2135–2145. 10.1523/jneurosci.1922-17.2018
- Leuner, B., & Gould, E. (2009). Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev.Psych.093008.100359*, *61*, 111–140. 10.1146/annurev.psych.093008.100359
- Leung, B., Shimeld, S. M., Jenkinson, E. H., Fell, J., & Bbsrc, ; (2019). Evolution of vertebrate spinal cord patterning. *Developmental Dynamics*, 248(11), 1028– 1043.10.1002/dvdy.77
- Lewis, S. (2011). Development: Pruning the dendritic tree (Nature Reviews Neuroscience). Nature Reviews Neuroscience, 12(9), 493. 10.1038/nrn3099
- Lewis, T. L., Courchet, J., & Polleux, F. (2013). Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *The Journal of Cell Biology*, 202(6), 837. 10.1083/jcb.201305098
- Li, W., Lv, L., & Luo, X. J. (2022). In vivo study sheds new light on the dendritic spine pathology hypothesis of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 27(4), 1866–1868. 10.1038/s41380-022-01449-2
- Lim, D. A., & Alvarez-buylla, A. (2016). The Adult Ventricular –Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harbor* perspectives in biology, 8(5), a018820. 10.1101/cshperspect.a018820.
- Lim, D., Kim, D., Um, J. W., & Ko, J. (2022). Reassessing synaptic adhesion pathways. *Trends in Neurosciences*, 45(7), 517–528. 10.1016/j.tins.2022.04.004
- Lin, Y. C., & Redmond, L. (2009). Neuronal CaMKII acts as a structural kinase. Communicative and Integrative Biology, 2(1), 40–41. 10.4161/cib.2.1.7426
- Lindsey, B. W., Hall, Z. J., Heuzé, A., Joly, J. S., Tropepe, V., & Kaslin, J. (2018). The role of neuro-epithelial-like and radial-glial stem and progenitor cells in development, plasticity, and repair. *Progress in Neurobiology*, 170, 99–114. 10.1016/j.pneurobio.2018.06.004
- Lisman, J., Buzsáki, G., Eichenbaum, H., Nadel, L., Ranganath, C., & Redish, A. D. (2017). Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nature neuroscience*, 20(11), 1434–1447. 10.1038/nn.4661
- Lledo, P. M., & Valley, M. (2016). Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 8(8), a018945. 10.1101/cshperspect.a018945
- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., & Martin-Villalba, A. (2015). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell*, 17(3), 329–340. 10.1016/j.stem.2015.07.002

- Long, K. R., & Huttner, W. B. (2019). How the extracellular matrix shapes neural development. *Open Biology*, 9(1). 10.1098/rsob.180216
- López-Mengual, A., Segura-Feliu, M., Sunyer, R., Sanz-Fraile, H., Otero, J., Mesquida-Veny, F., Gil, V., Hervera, A., Ferrer, I., Soriano, J., Trepat, X., Farré, R., Navajas, D., & del Río, J. A. (2022). Involvement of Mechanical Cues in the Migration of Cajal-Retzius Cells in the Marginal Zone During Neocortical Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 1–16. 10.3389/fcell.2022.886110
- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, *392*(10146), 508–520. 10.1016/S0140-6736(18)31129-2
- Lorenzi, H. A., & Reeves, R. H. (2006). Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development. *Brain Research*, *1104*(1), 153–10.1016/j.brainres.2006.05.022
- Lee, M. K., & Cleveland, D. W. (1996). Neuronal intermediate filaments. Annual review of neuroscience, 19, 187–217. 10.1146/annurev.ne.19.030196.001155
- Magee, J. C., & Grienberger, C. (2020). Synaptic Plasticity Forms and Functions. Annual Review of Neur, 43, 95–117. 10.1146/Annurev-neuro-090919-022842
- Makino, T., & McLysaght, A. (2010). Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(20), 9270–9274. 10.1073/pnas.0914697107
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), 5–21.10.1016/j.neuron.2004.09.012
- Mao, Y., & Freeman, M. (2009). Fasciclin 2, the Drosophila orthologue of neural celladhesion molecule, inhibits EGF receptor signalling. 481, 473–481. 10.1242/dev.026054
- Marín, O., & Rubenstein, J. L. R. (2003). Cell migration in the forebrain. Annual Review of Neuroscience, 26(Figure 1), 441–483. /10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058
- Marín, O., Valiente, M., Ge, X., & Tsai, L. H. (2010). Guiding Neuronal Cell Migrations. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2(2). 0.1101/cshperspect.a001834
- Martinez-Garay, I. (2020). Molecular Mechanisms of Cadherin Function During Cortical Migration. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8, 1–8. 0.3389/fcell.2020.588152
- Mehrabian, M., Hildebrandt, H., & Schmitt-Ulms, G. (2016). NCAM1 Polysialylation: The Prion Protein's Elusive Reason for Being? ASN Neuro, 8(6). 10.1177/1759091416679074

- Ménager, C., Arimura, N., Fukata, Y., & Kaibuchi, K. (2004). PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *Journal of Neurochemistry*, 89(1), 109–118. 10.1046/j.1471-4159.2004.02302.x
- Mendoza, M. B., Gutierrez, S., Ortiz, R., Moreno, D. F., Dermit, M., Dodel, M., Rebollo, E., Bosch, M., Mardakheh, F. K., & Gallego, C. (2021). The elongation factor eEF1A2 controls translation and actin dynamics in dendritic spines. *Science signaling*, 14(691). 10.1126/scisignal.abf5594
- Meng, W., & Takeichi, M. (2009). Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 1(6), a002899. 10.1101/cshperspect.a002899
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 317(5836), 381– 384.10.1126/science.1144914
- Mich, J. K., Signer, R. A., Nakada, D., Pineda, A., Burgess, R. J., Vue, T. Y., Johnson, J. E., & Morrison, S. J. (2014). Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. eLife, 3, e02669. 10.7554/eLife.02669
- Ming, G. li, & Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 70(4), 687–702. 10.1016/j.neuron.2011.05.001
- Mira, H., & Morante, J. (2020). Neurogenesis From Embryo to Adult Lessons From Flies and Mice. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 533. 10.3389/fcell.2020.00533/bibtex
- Miranda-Negrón, Y., & García-Arrarás, J. E. (2022). Radial glia and radial glia-like cells: Their role in neurogenesis and regeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 1–18. 10.3389/fnins.2022.1006037
- Missaire, M., & Hindges, R. (2015). The role of cell adhesion molecules in visual circuit formation: From neurite outgrowth to maps and synaptic specificity. *Developmental Neurobiology*, 75(6), 569–583. 10.1002/dneu.22267
- Missler, M. (2003). Synaptic cell adhesion goes functional. *Trends in Neurosciences*, 26(4), 176–178. 10.1016/s0166-2236(03)00066-3
- Missler, M., Su, T. C., & Biederer, T. (2012). Synaptic Cell Adhesion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, 1–18. 10.1101/cshperspect.a005694
- Miyamoto, Y., Sakane, F., & Hashimoto, K. (2015). N-cadherin-based adherens junction regulates the maintenance, proliferation, and differentiation of neural progenitor cells during development. *Cell Adhesion & Migration*, 9(3), 183. 10.1080/19336918.2015.1005466

- Molloy, C. A., Keddache, M., & Martin, L. J. (2005). Evidence for linkage on 21q and 7q in a subset of autism characterized by developmental regression. *Molecular Psychiatry*, 10(8), 741–746. 10.1038/sj.mp.4001691
- Monday, H. R., & Castillo, P. E. (2017). Closing the gap: long-term presynaptic plasticity in brain function and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 106. 10.1016/j.conb.2017.05.011
- Moore, S. A., & Iulianella, A. (2021). Development of the mammalian cortical hem and its derivatives: The choroid plexus, Cajal-Retzius cells and hippocampus. *Open Biology*, 11(5). 10.1098/rsob.210042
- Morales, A. V., & Mira, H. (2019). Adult Neural Stem Cells: Born to Last. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 7. 10.3389/fcell.2019.00096
- Morante-Redolat, J. M., & Porlan, E. (2019). Neural stem cell regulation by adhesion molecules within the subependymal niche. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 102. 10.3389/fcell.2019.00102
- Moreland, T., & Poulain, F. E. (2022). To Stick or Not to Stick: The Multiple Roles of Cell Adhesion Molecules in Neural Circuit Assembly. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 552. 10.3389/fnins.2022.889155
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine 2019 25:4*, 25(4), 554–560. 10.1038/s41591-019-0375-9
- Moreno-Jiménez, E. P., Terreros-Roncal, J., Flor-García, M., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2021). Evidences for Adult Hippocampal Neurogenesis in Humans. *The Journal of Neuroscience*, 41(12), 2541–2553. 10.1523/jneurosci.0675-20.2020
- Morizur, L., Chicheportiche, A., Gauthier, L. R., Daynac, M., Boussin, F. D., & Mouthon, M. A. (2018). Distinct Molecular Signatures of Quiescent and Activated Adult Neural Stem Cells Reveal Specific Interactions with Their Microenvironment. Stem Cell Reports, 11(2), 565–577. 10.1016/j.stemcr.2018.06.005
- Muller, D., Mendez, P., DeRoo, M., Klauser, P., Steen, S., & Poglia, L. (2010). Role of NCAM in Spine dynamics and synaptogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 663, 245–256. 10.1007/978-1-4419-1170-4_16
- Murphy, K. E., Wade, S. D., Sperringer, J. E., Mohan, V., Duncan, B. W., Zhang, E. Y., Lutz, D., Schachner, M., & Maness, P. F. (2023). The L1 cell adhesion molecule constrains dendritic spine density in pyramidal neurons of the mouse cerebral cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 17:1111525, 1–11. 10.3389/fnana.2023.1111525

- Nadarajah, B., & Parnavelas, J. G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience 2002 3:6*, 3(6), 423– 10.1038/nrn845
- Nagappan-Chettiar, S., Johnson-Venkatesh, E. M., & Umemori, H. (2017). Activity-dependent proteolytic cleavage of cell adhesion molecules regulates excitatory synaptic development and function. *Neuroscience research*, *116*, 60– 69. 10.1016/j.neures.2016.12.003
- Nakahata, Y., & Yasuda, R. (2018). Plasticity of spine structure: Local signaling, translation and cytoskeletal reorganization. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10(AUG), 29. 10.3389/fnsyn.2018.00029
- Namba, T., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Xu, C., Takano, T., & Kaibuchi, K. (2015). Extracellular and intracellular signaling for neuronal polarity. *Physiological Reviews*, 95(3), 995–1024. 10.1152/physrev.00025.2014
- Namba, T., Kibe, Y., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Takano, T., Ueno, T., Shimada, A., Kozawa, S., Okamoto, M., Shimoda, Y., Oda, K., Wada, Y., Masuda, T., Sakakibara, A., Igarashi, M., Miyata, T., Faivre-Sarrailh, C., Takeuchi, K., & Kaibuchi, K. (2014). Pioneering Axons Regulate Neuronal Polarization in the developing cerebral cortex. *neuron*, *81*(4), 814–829. 10.1016/j.neuron.2013.12.015
- Navlakha, S., Barth, A. L., & Bar-Joseph, Z. (2015). Decreasing-Rate Pruning Optimizes the Construction of Efficient and Robust Distributed Networks. *PLoS Computational Biology*, 11(7). 10.1371/journal.pcbi.1004347
- Nelson, E. A., Walker, S. R., Li, W., Liu, X. S., & Frank, D. A. (2006). Identification of Human STAT5-dependent Gene Regulatory Elements Based on Interspecies Homology. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26216–26224. 10.1074/jbc.m605001200
- Nicole, O., & Pacary, E. (2020). Camkiiβ in neuronal development and plasticity: An emerging candidate in brain diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–15. 10.3390/ijms21197272
- Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281–290. 10.1016/j.neuron.2016.12.015
- Niederhoffer, K. Y., Fahiminiya, S., Eydoux, P., Mawson, J., Nishimura, G., Jerome-Majewska, L. A., & Patel, M. S. (2016). Diagnosis of Van den Ende-Gupta syndrome: Approach to the Marden-Walker-like spectrum of disorders. *American journal of medical genetics. Part A*, 170(9), 2310–2321. 10.1002/ajmg.a.37831
- Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., & Schachner, M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *Journal of Cell Biology*, 157(3), 521–532. 10.1083/jcb.200109059

- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeño, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience 2004* 7:2, 7(2), 136–144. 10.1038/nn1172
- Obernier, K., & Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development (Cambridge, England)*, 146(4). 10.1242/dev.156059
- Ortega, J. A., Memi, F., Radonjic, N., Filipovic, R., Bagasrawala, I., Zecevic, N., & Jakovcevski, I. (2018). The Subventricular Zone: A Key Player in Human Neocortical Development. The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry, 24(2), 156–170. 10.1177/1073858417691009
- Osanai, H., Nair, I. R., & Kitamura, T. (2023). Dissecting cell-type-specific pathways in medial entorhinal cortical-hippocampal network for episodic memory. *Journal of neurochemistry*. 10.1111/jnc.15850.
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333(6048), 1456–1458. 10.1126/science.1202529
- Paoloni-Giacobino, A., Chen, H., & Antonarakis, S. E. (1997). Cloning of a novel human neural cell adhesion molecule gene (NCAM2) that maps to chromosome region 21q21 and is potentially involved in Down syndrome. *Genomics*, 43(1), 43–51. 10.1006/geno.1997.4782
- Paridaen, J. T., & Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Reports*, 15(4), 351–364. 10.1002/embr.201438447
- Park, S. H. E., Ortiz, A. K., & Konopka, G. (2022). Corticogenesis across species at single-cell resolution. *Developmental Neurobiology*, 82(6), 517–532. 10.1002/dneu.22896
- Park, Y., & Goda, Y. (2016). Integrins in synapse regulation. Nature Reviews Neuroscience, 17(12), 745–756. 10.1038/nrn.2016.138
- Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2020). Dendritic Spines Shape Analysis— Classification or Clusterization? Perspective. Frontiers in Synaptic Neuroscience, 12. 10.3389/fnsyn.2020.00031

- Pébusque, M. J., Coulier, F., Birnbaum, D., & Pontarotti, P. (1998). Ancient largescale genome duplications: Phylogenetic and linkage analyses shed light on chordate genome evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 15(9), 1145–1159. 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026022
- Pebworth, M. P., Ross, J., Andrews, M., Bhaduri, A., & Kriegstein, A. R. (2021). Human intermediate progenitor diversity during cortical development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118(26), 1–10. 10.1073/pnas.2019415118
- Penzes, P., & VanLeeuwen, J. E. (2011). Impaired regulation of synaptic actin cytoskeleton in Alzheimer's disease. In *Brain Research Reviews*, 67(1-2), 184– 192). 10.1016/j.brainresrev.2011.01.003
- Petit, F., Plessis, G., Decamp, M., Cuisset, J. M., Blyth, M., Pendlebury, M., & Andrieux, J. (2015). 21q21 deletion involving NCAM2: Report of 3 cases with neurodevelopmental disorders. *European Journal of Medical Genetics*, 58(1), 44–46. 10.1016/j.ejmg.2014.11.004
- Pham, E., Crews, L., Ubhi, K., Hansen, L., Adame, A., Cartier, A., Salmon, D., Galasko, D., Michael, S., Savas, J. N., Yates, J. R., Glabe, C., & Masliah, E. (2010). Progressive accumulation of amyloid-β oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS Journal*, 277(14), 3051–3067. 10.1111/j.1742-4658.2010.07719.x
- Polanco, J., Reyes-Vigil, F., Weisberg, S. D., Dhimitruka, I., & Brusés, J. L. (2021). Differential Spatiotemporal Expression of Type I and Type II Cadherins Associated With the Segmentation of the Central Nervous System and Formation of Brain Nuclei in the Developing Mouse. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14(March), 1–21. 10.3389/fnmol.2021.633719
- Pollerberg, G. E., Thelen, K., Theiss, M. O., & Hochlehnert, B. C. (2013). The role of cell adhesion molecules for navigating axons: Density matters. *Mechanisms of Development*, 130(6–8), 359–372. /10.1016/j.mod.2012.11.002
- Porlan, E., Martí-Prado, B., Morante-Redolat, J. M., Consiglio, A., Delgado, A. C., Kypta, R., López-Otín, C., Kirstein, M., & Fariñas, I. (2014). MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. *Nature Cell Biology 2014* 16:7, 16(7), 629–638. 10.1038/NCB2993
- Prigge, C. L., & Kay, J. N. (2018). Dendrite morphogenesis from birth to adulthood. *Current Opinion in Neurobiology*, 53, 139–145. 10.1016/j.conb.2018.07.007

- Pujadas, L., Gruart, A., Bosch, C., Delgado, L., Teixeira, C. M., Rossi, D., De Lecea, L., Martínez, A., Delgado-García, J. M., & Soriano, E. (2010). Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and longterm potentiation. *Journal of Neuroscience*, 30(13), 4636–4649. 10.1523/jneurosci.5284-09.2010
- Puram, S. V., & Bonni, A. (2013). Cell-intrinsic drivers of dendrite morphogenesis. Development, 140(23), 4657–4671. 10.1242/dev.087676
- Puram, S. V., Kim, A. H., Ikeuchi, Y., Wilson-Grady, J. T., Merdes, A., Gygi, S. P., & Bonni, A. (2011). A CaMKIIβ 2 signaling pathway at the centrosome regulates dendrite patterning in the brain. *Nature Neuroscience*, 14(8), 973–983. 10.1038/nn.2857
- Rakic, P., Hashimoto-Torii, K., & Sarkisian, M. R. (2008). Genetic Determinants of Neuronal Migration in the Cerebral Cortex. *Cortical Development: Genes and Genetic Abnormalities*, 45–58. 10.1002/9780470994030.ch4
- Rangaraju, V., tom Dieck, S., & Schuman, E. M. (2017). Local translation in neuronal compartments: how local is local? *EMBO Reports*, 18(5), 693–711. 10.15252/embr.201744045
- Rasmussen, Kim K., Kulahin, N., Kristensen, O., Poulsen, J. C. N., Sigurskjold, B. W., Kastrup, J. S., Berezin, V., Bock, E., Walmod, P. S., & Gajhede, M. (2008). Crystal Structure of the Ig1 Domain of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM2 Displays Domain Swapping. *Journal of Molecular Biology*, 382(5), 1113–1120. 10.1016/j.jmb.2008.07.084
- Rasmussen, Kim Krighaar, Falkesgaard, M. H., Winther, M., Roed, N. K., Quistgaard, C. L., Teisen, M. N., Edslev, S. M., Petersen, D. L., Aljubouri, A., Christensen, C., Thulstrup, P. W., Lo Leggio, L., Teilum, K., & Walmod, P. S. (2018). NCAM2 Fibronectin type-III domains form a rigid structure that binds and activates the Fibroblast Growth Factor Receptor. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. 10.1038/s41598-018-27089-7
- Richards, S. E. V., Moore, A. R., Nam, A. Y., Saxena, S., Paradis, S., & van Hooser, S. D. (2020). Experience-dependent development of dendritic arbors in mouse visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 40(34), 6536–6556. 10.1523/jneurosci.2910-19.2020
- Rochefort, N. L., & Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. EMBO Reports, 13(8), 699–708. 10.1038/embor.2012.102
- Ruan, X., Kang, B., Qi, C., Lin, W., Wang, J., & Zhang, X. (2021). Progenitor cell diversity in the developing mouse neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(10). 10.1073/pnas.2018866118

- Runge, K., Cardoso, C., & de Chevigny, A. (2020). Dendritic Spine Plasticity: Function and mechanisms. *frontiers in synaptic neuroscience*, 12, 36. 10.3389/fnsyn.2020.00036/bibtex
- Sahara, S., & O'Leary, D. D. M. (2009). Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron*, 63(1), 48–62. 10.1016/j.neuron.2009.06.006
- Sainio, M. T., Rasila, T., Molchanova, S. M., Järvilehto, J., Torregrosa-Muñumer, R., Harjuhaahto, S., Pennonen, J., Huber, N., Herukka, S. K., Haapasalo, A., Zetterberg, H., Taira, T., Palmio, J., Ylikallio, E., & Tyynismaa, H. (2022). Neurofilament Light Regulates Axon Caliber, Synaptic Activity, and Organelle Trafficking in Cultured human motor neurons. *frontiers in cell and developmental biology*, 9, 820105. 10.3389/fcell.2021.820105
- Sakakibara, A., & Hatanaka, Y. (2015). Neuronal polarization in the developing cerebral cortex. 9, 1–10. 10.3389/fnins.2015.00116
- Sakurai, T. (2017). The role of cell adhesion molecules in brain wiring and neuropsychiatric disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 81, 4–11. 10.1016/j.mcn.2016.08.005
- Sánchez-Huertas, C., & Herrera, E. (2021). With the Permission of Microtubules: An Updated Overview on Microtubule Function During Axon Pathfinding. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. 10.3389/fnmol.2021.759404
- Sanes, J. R., & Zipursky, S. L. (2020). Synaptic Specificity, Recognition Molecules, and Assembly of Neural Circuits. *Cell*, 181(3), 536–556. 10.1016/j.cell.2020.04.008
- Sarnat, H. B. (2022). Axonal pathfinding during the development of the nervous system. *Annals of the Child Neurology Society*. 10.1002/cns3.2
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74(4), 691–705. j.neuron.2012.03.026
- Scheff, S. W., & Price, D. A. (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: A review of ultrastructural studies. *Neurobiology of Aging*, 24(8), 1029–1046. 10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.002
- Schelski, M., & Bradke, F. (2017). Neuronal polarization: From spatiotemporal signaling to cytoskeletal dynamics. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 84, 11– 28. 10.1016/j.mcn.2017.03.008
- Schmid, R., & Maness, P. (2008). L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(3), 245–250. 10.1016/j.conb.2008.07.015

- Scholz, C., Steinemann, D., Mälzer, M., Roy, M., Arslan-Kirchner, M., Illig, T., Schmidtke, J., & Stuhrmann, M. (2016). NCAM2 deletion in a boy with macrocephaly and autism: Cause, association or predisposition? *European Journal of Medical Genetics*, 59(10), 493–498. 10.1016/j.ejmg.2016.08.006
- Schwab, M. E. (2010). Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nature*, 11. 10.1038/nrn2936
- Segklia, A., Seuntjens, E., Elkouris, M., Tsalavos, S., & Stappers, E. (2012). Bmp7 Regulates the Survival, Proliferation, and Neurogenic Properties of Neural Progenitor Cells during Corticogenesis in the Mouse. *PLoS ONE*, 7(3), 34088. 10.1371/journal.pone.0034088
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 298(5594) 789–791). 10.1126/science.1074069
- Shapiro, L., Love, J., & Colman, D. R. (2007). Adhesion molecules in the nervous system: Structural insights into function and diversity. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 451–47410.1146/annurev.neuro.29.051605.113034
- Sheng, L., Leshchyns'ka, I., & Sytnyk, V. (2019). Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2)-Induced c-Src-Dependent Propagation of Submembrane Ca 2+ Spikes Along Dendrites Inhibits Synapse Maturation. *Cerebral Cortex*, 29(4), 1439–1459. 0.1093/cercor/bhy041
- Sheng, L., Leshchyns'Ka, I., & Sytnyk, V. (2015). Neural cell adhesion molecule 2 promotes the formation of filopodia and neurite branching by inducing submembrane increases in Ca2+ levels. *Journal of Neuroscience*, 35(4), 1739– 1752. 10.1523/jneurosci.1714-14.2015
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 823–847. 10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029
- Sheng, M., & Kim, M. J. (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science*, 298(5594), 776–780. 10.1126/science.1075333
- Shi, S. H., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2003). Hippocampal Neuronal Polarity Specified by Spatially Localized mPar3/mPar6 and PI 3-Kinase Activity. *Cell*, 112(1), 63–75. 10.1016/S0092-8674(02)01249-7
- Shibata, A. C. E., Ueda, H. H., Eto, K., Onda, M., Sato, A., Ohba, T., Nabekura, J., & Murakoshi, H. (2021). Photoactivatable CaMKII induces synaptic plasticity in single synapses. *Nature Communications*, 12, 1–15. 10.1038/s41467-021-21025-6
- Shin, J., Berg, D. A., Zhu, Y., Shin, J. Y., Song, J., Bonaguidi, M. A., Enikolopov, G., Nauen, D. W., Christian, K. M., Ming, G. L., & Song, H. (2015). Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell*, 17(3), 360–372. 10.1016/j.stem.2015.07.013

- Shin, M. H., Lee, E. G., Lee, S. H., Lee, Y. S., & Son, H. (2002). Neural cell adhesion molecule (NCAM) promotes the differentiation of hippocampal precursor cells to a neuronal lineage, especially to a glutamatergic neural cell type. *Experimental and Molecular Medicine*, 34(6), 401–410. 10.1038/emm.2002.57
- Sinnar, S. A., Antoku, S., Saffin, J. M., Cooper, J. A., & Halpain, S. (2014). Capping protein is essential for cell migration in vivo and for filopodial morphology and dynamics. *Molecular Biology of the Cell*, 25(14), 2152–2160. 10.1091/mbc.e13-12-0749
- Solecki D. J. (2012). Sticky situations: recent advances in control of cell adhesion during neuronal migration. *Current opinion in neurobiology*, 22(5), 791–798. 10.1016/j.conb.2012.04.010
- Solozobova, V., Wyvekens, N., & Pruszak, J. (2012). Lessons from the Embryonic Neural Stem Cell Niche for Neural Lineage Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(3), 813–829. 10.1007/s12015-012-9381-8
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377–381. 10.1038/nature25975
- Sotelo, C. (2004). Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Progress in Neurobiology*, 72(5), 295–339. 10.1016/j.pneurobio.2004.03.004
- Spead, O., & Poulain, F. E. (2020). Trans-axonal signaling in neural circuit wiring. International Journal of Molecular Sciences, 21(14), 1–19. 10.3390/ijms21145170
- Stahnisch, F. W., & Nitsch, R. (2002). Santiago Ramón y Cajal's concept of neuronal plasticity: The ambiguity lives on. *Trends in Neurosciences*, 25(11), 589–591. 10.1016/s0166-2236(02)02251-8
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., Micheva, K. D., Mehalow, A. K., Huberman, A. D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A. M. M., Lambris, J. D., Smith, S. J., John, S. W. M., & Barres, B. A. (2007). The classical complement cascade mediates SNC synapse elimination. *Cell*, 131(6), 1164–1178. 10.1016/j.cell.2007.10.036
- Steward, O., & Schuman, E. M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. Annual Review of Neuroscience, 24, 299–325. 10.1146/annurev.neuro.24.1.299
- Stiess, M., & Bradke, F. (2011). Neuronal polarization: The cytoskeleton leads the way. Developmental Neurobiology, 71(6), 430–444. 10.1002/dneu.20849

- Stoeckli, E. T. (2018). Understanding axon guidance: Are we nearly there yet? *Development*, 145(10). 10.1242/dev.151415
- Subramanian, J., Savage, J. C., & Tremblay, M.-ève. (2020). Synaptic Loss in Alzheimer 's Disease: Mechanistic Insights Provided by Two-Photon in vivo Imaging of Transgenic Mouse Models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. 10.3389/fncel.2020.592607
- Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. Nature, 455(7215), 903–911. 10.1038/nature07456
- Südhof, T. C. (2018). Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron*, 100(2), 276–293. 10.1016/j.neuron.2018.09.040
- Südhof T. C. (2021). The cell biology of synapse formation. *The Journal of cell biology*, 220(7), e202103052. 10.1083/jcb.202103052
- Sumi, T., & Harada, K. (2020). Mechanism underlying hippocampal long-term potentiation and depression based on competition between endocytosis and exocytosis of AMPA receptors. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. 10.1038/s41598-020-71528-3
- Sun, C., Nold, A., Fusco, C. M., Rangaraju, V., Tchumatchenko, T., Heilemann, M., & Schuman, E. M. (2021). The prevalence and specificity of local protein synthesis during neuronal synaptic plasticity. *Science Advances*, 7(38), 1–13. 10.1126/sciadv.abj0790
- Suter, D. M., & Miller, K. E. (2011). The Emerging Role of Forces in Axonal Elongation. *Progress in Neurobiology*, 94(2), 91. 10.1016/j.pneurobio.2011.04.002
- Suter, T. A. C. S., Blagburn, S. V., Fisher, S. E., Anderson-Keightly, H. M., D'Elia, K. P., & Jaworski, A. (2020). TAG-1 Multifunctionality Coordinates Neuronal Migration, Axon Guidance, and Fasciculation. *Cell Reports*, 30(4), 1164-1177.e7. 10.1016/j.celrep.2019.12.085
- Sytnyk, V., Leshchyns'Ka, I., Nikonenko, A. G., & Schachner, M. (2006). NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex. *Journal of Cell Biology*, 174(7), 1071–1085. 10.1083/jcb.200604145
- Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., & Schachner, M. (2017). Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily Regulate Synapse Formation, Maintenance, and Function. In *Trends in Neurosciences*, 40(5), 295–308. 10.1016/j.tins.2017.03.003
- Tahirovic, S., & Bradke, F. (2009). Neuronal polarity. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 1(3), 1–17. 10.1101/cshperspect.a001644

- Takano, T., Funahashi, Y., & Kaibuchi, K. (2019). Neuronal polarity: Positive and negative feedback signals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 69. 10.3389/fcell.2019.00069
- Takano, T., Xu, C., Funahashi, Y., Namba, T., & Kaibuchi, K. (2015). Neuronal polarization. *Development*, *142*(12), 2088–2093. 10.1242/dev.114454
- Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J., & Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron*, 83(5), 1131–1143. 10.1016/j.neuron.2014.07.040
- Tata, M., Wall, I., Joyce, A., Vieira, J. M., Kessaris, N., & Ruhrberg, C. (2016). Regulation of embryonic neurogenesis by germinal zone vasculature. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113(47), 13414–13419. 10.1073/pnas.1613113113
- Taverna, E., Götz, M., & Huttner, W. B. (2014). The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. Annual review of cell and developmental biology, 30, 465–502. 10.1146/annurev-cellbio-101011-155801
- Teixeira, C. M., Kron, M. M., Masachs, N., Zhang, H., Lagace, D. C., Martinez, A., Reillo, I., Duan, X., Bosch, C., Pujadas, L., Brunso, L., Song, H., Eisch, A. J., Borrell, V., Howell, B. W., Parent, J. M., & Soriano, E. (2012). Cellautonomous inactivation of the reelin pathway impairs adult neurogenesis in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 32(35), 12051–12065. 10.1523/jneurosci.1857-12.2012
- Sudhof T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual review of neuroscience*, 27, 509–547. 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412
- Toda, T., & Gage, F. H. (2018). Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell and Tissue Research*, 373(3), 693–709. 10.1007/s00441-017-2735-4
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., & Takeichi, M. (2002). Cadherin Regulates Dendritic Spine Morphogenesis. *Neuron*, 35, 77– 89. 10.1016/s0896-6273(02)00748-1
- Togashi, H., Sakisaka, T., & Takai, Y. (2009). Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adhesion & Migration*, 3(1), 29. /10.4161/cam.3.1.6773
- Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., & Nägerl, U. V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience*, 17(5), 678– 685. 10.1038/nn.3682

- Tonosaki, M., Itoh, K., Umekage, M., Kishimoto, T., Yaoi, T., Lemmon, V. P., & Fushiki, S. (2014). L1cam is crucial for cell locomotion and terminal translocation of the soma in radial migration during murine corticogenesis. *PLoS ONE*, 9(1), 3–10. 10.1371/journal.pone.0086186
- Toyo-oka, K., Shionoya, A., Gambello, M., Cardoso, C., Leventer, R., Ward, H., Ayala, R., Tsai, L., Dobyns, W., Ledbetter, D., Hirotsune, S., & Wynshaw-Boris, A. (2003). 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nature Genetics*, 34(3), 274–285. 10.1038/ng1169
- Treloar, H. B., Purcell, A. L., & Greer, C. A. (1999). Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology*, 413(2), 289– 304.
- Urbán, N, & Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. 10.3389/fncel.2014.00396
- Urbán, Noelia, Blomfield, I. M., & Guillemot, F. (2019). Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest. *Neuron*, 104(5), 834–848). 10.1016/j.neuron.2019.09.026
- Urbán, N. & Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 396. 10.3389/fncel.2014.00396
- Vilchez-Acosta, A., Manso, Y., Cardenas, A., Elias-Tersa, A., Martinez-Losa, M., Pascual, M., Alvarez-Dolado, M., Nairn, A. C., Borrell, V., & Soriano, E. (2022). Specific contribution of Reelin expressed by Cajal-Retzius cells or GABAergic interneurons to cortical lamination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(37). 10.1073/pnas.2120079119/-/dcsupplemental
- Vogenstahl, J., Parrilla, M., Acker-Palmer, A., & Segarra, M. (2022). Vascular Regulation of Developmental Neurogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 859. 10.3389/fcell.2022.890852
- Von Campenhausen, H., Yoshihara, Y., & Mori, K. (1997a). OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. *NeuroReport*, 8(11), 2607–2612. 10.1097/00001756-199707280-00037
- Von Campenhausen, H., Yoshihara, Y., & Mori, K. (1997b). OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. *NeuroReport*, 8(11), 2607–2612. 10.1097/00001756-199707280-00037
- Waites, C. L., Craig, A. M., & Garner, C. C. (2005). Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. Annual review of neuroscience, 28, 251–274. 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144336

- Walz, A., Mombaerts, P., Greer, C. A., & Treloar, H. B. (2006). Disrupted compartmental organization of axons and dendrites within olfactory glomeruli of mice deficient in the olfactory cell adhesion molecule, OCAM. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 32(1–2), 1–14. 10.1016/j.mcn.2006.01.013
- Washbourne, P. (2014). Synapse Assembly and Neurodevelopmental Disorders. Neuropsychopharmacology 2015 40:1, 40(1), 4–15. 10.1038/npp.2014.163
- Weinhard, L., di Bartolomei, G., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N. L., Neniskyte, U., Exiga, M., Vadisiute, A., Raggioli, A., Schertel, A., Schwab, Y., & Gross, C. T. (2018). Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nature communications*, 9(1), 1228. 10.1038/s41467-018-03566-5
- Windsperger, K., & Hoehl, S. (2021). Development of Down Syndrome Research Over the Last Decades–What Healthcare and Education Professionals Need to Know. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 2313. 10.3389/fpsyt.2021.749046
- Winther, M., Berezin, V., & Walmod, P. S. (2012). NCAM2/OCAM/RNCAM: Cell adhesion molecule with a role in neuronal compartmentalization. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(3), 441–446. 10.1016/j.biocel.2011.11.020
- Witte, H., Neukirchen, D., & Bradke, F. (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *Journal of Cell Biology*, 180(3), 619–632. 10.1083/jcb.200707042
- Yamada, J., Nadanaka, S., Kitagawa, H., Takeuchi, X. K., & Jinno, X. S. (2018). Increased Synthesis of Chondroitin Sulfate Proteoglycan Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis in Response to Enriched Environment. 38(39), 8496–8513. 10.1523/jneurosci.0632-18.2018
- Yamagata, M., Sanes, J. R., & Weiner, J. A. (2003). Synaptic adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5), 621–632. 10.1016/S0955-0674(03)00107-8
- Yang, Y., & Calakos, N. (2013). Presynaptic long-term plasticity. Frontiers in Synaptic Neuroscience, 5, 1–22. 10.3389/fnsyn.2013.00008
- Yao, B., Christian, K. M., He, C., Jin, P., Ming, G. L., & Song, H. (2016). Epigenetic mechanisms in neurogenesis. In *Nature Reviews Neuroscience*, 17(9), 537–549.10.1038/nrn.2016.70
- Yasuda, R., Hayashi, Y., & Hell, J. W. (2022). CaMKII: a central molecular organizer of synaptic plasticity, learning and memory. *Nature Reviews Neuroscience 2022 23:11, 23*(11), 666–682. 10.1038/s41583-022-00624-2

- Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tamada, A., Fujita, H., Hayashi, H., Kagamiyama, H., & Mori, K. (1997). OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *Journal of Neuroscience*, 17(15), 5830–5842. 10.1523/jneurosci.17-15-05830.1997
- Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, & Nixon, R. A. (2017). Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4). 10.1101/cshperspect.a018309
- Yusifov, R., Tippmann, A., Staiger, J. F., Schlüter, O. M., & Löwel, S. (2021). Spine dynamics of PSD-95-deficient neurons in the visual cortex link silent synapses to structural cortical plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118*(10), e2022701118. 10.1073/pnas.2022701118
- Zang, Y., Chaudhari, K., & Bashaw, G. J. (2021). New insights into the molecular mechanisms of axon guidance receptor regulation and signaling. *Current Topics in Developmental Biology*, 142, 147–196. 10.1016/bs.ctdb.2020.11.008
- Zappaterra, M. W., & Lehtinen, M. K. (2012). The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 69(17), 2863–2878. 10.1007/s00018-012-0957-x
- Zeng, M., Chen, X., Guan, D., Xu, J., Wu, H., Tong, P., & Zhang, M. (2018). Reconstituted Postsynaptic Density as a Molecular Platform for Understanding Synapse Formation and Plasticity. *Cell*, 174(5), 1172-1187.e16. 10.1016/j.cell.2018.06.047
- Zhang, L., & Zhang, X. (2018). Factors Regulating Neurogenesis in the Adult Dentate Gyrus. *The Hippocampus - Plasticity and Functions*. InTech. 10.5772/intechopen.75631
- Zhao, B., Meka, D. P., Scharrenberg, R., König, T., Schwanke, B., Kobler, O., Windhorst, S., Kreutz, M. R., Mikhaylova, M., & Calderon De Anda, F. (2017). Microtubules Modulate F-actin Dynamics during Neuronal Polarization. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. 10.1038/s41598-017-09832-8
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645–660. 10.1016/j.cell.2008.01.033
- Zhong, S., Ding, W., Sun, L., Lu, Y., Dong, H., Fan, X., Liu, Z., Chen, R., Zhang, S., Ma, Q., Tang, F., Wu, Q., & Wang, X. (2020). Decoding the development of the human hippocampus. *Nature*, 577(7791), 531–536. 10.1038/s41586-019-1917-5

