

RESUMEN

La glicoproteína de membrana neuronal Gpm6a pertenece a la familia de proteínas proteolipídicas y se expresa de manera abundante en neuronas del sistema nervioso central. El rol de Gpm6a en el sistema nervioso central aún no se comprende por completo pero existe evidencia de su participación en la diferenciación y desarrollo neuronal siendo importante para la formación de filopodios, la extensión de neuritas y la sinaptogénesis. A partir de resultados previos de nuestro laboratorio, sabemos que Gpm6a induce la formación de filopodios sin embargo mecanismo por el cual Gpm6a ejerce su función no se conoce en la actualidad.

En el presente trabajo identificamos los residuos K250, K255 y E258 en el extremo C-terminal como cruciales para esta función, ya que sus mutaciones resultaron en una inhibición en la formación de filopodios en neuronas de hipocampo. En particular, la sustitución de E258 a alanina demostró un incremento de la acumulación citoplasmática de Gpm6a, mayor colocalización con estructuras Lamp1-positivas, menor expresión y menor presencia en la superficie celular sugiriendo que la sustitución de este residuo afecta el tráfico intracelular de Gpm6a que contribuye a su función neuroplástica.

En humanos las alteraciones en los niveles de expresión y en la secuencia de *GPM6A* han sido asociadas a diferentes patologías neuropsiquiátricas dentro de las cuales se encuentra la enfermedad de Alzheimer. Además, se ha demostrado que Gpm6a participa en la diferenciación de células madre pluripotentes embrionarias humanas. En este trabajo empleamos un modelo de células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSCs) para demostrar que la expresión de *GPM6A* está disminuida en progenitores

neuronales y en neuronas diferenciadas de líneas celulares derivadas de personas con diagnóstico de Alzheimer. Cabe destacar, que su expresión es más baja en la línea celular UB068 que coincide con la presencia del alelo APOE4, el factor principal de riesgo para desarrollar EA.

Por otro lado, demostramos que en líneas celulares de iPSCs la expresión de GPM6A varía en función de presencia del gen de fusión CHRFAM7A. CHRFAM7A es un gen exclusivamente humano que modula la actividad del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) el cual tiene un papel clave en la enfermedad de Alzheimer, alterando el flujo de Ca^{2+} intracelular y la captación de β -amiloide por el receptor $\alpha 7$. En la población existen tres alelos para este gen: el alelo ancestral que carece del gen de fusión (0 copias, 1% de la población humana), el gen de fusión en la orientación directa (CHRFAM7A) y el gen de fusión en orientación invertida con una delección de 2 pares de bases en el exón 6 (CHRFAM7A $\Delta 2bp$) que regulan de manera diferente al receptor $\alpha 7$.

Utilizando líneas isogénicas observamos que la presencia del gen de fusión CHRFAM7A en forma directa tiene efecto dual en la expresión de GPM6A dependiendo del estadio de desarrollo. En neuronas, la presencia del gen de fusión CHRFAM7A en la forma directa correlaciona con mayor expresión de GPM6A y coincide con mayor diferenciación de neuronas derivadas de iPSCs mostrando un aumento en la proporción de espinas dendríticas y en el largo de los procesos neuronales.

En progenitores neuronales con el gen de fusión CHRFAM7A en forma directa la expresión de GPM6A es más baja. Al analizar la morfología de las células observamos que baja expresión de Gpm6a coincide con falta de diferenciación neuronal y las neuritas más cortas. Sin embargo, la sobreexpresión de GPM6A exógena silvestre o mutante no funcional E258A no causa ningún efecto en la extensión de neuritas en progenitores neuronales de esta línea. Por otro lado, observamos mayor dinámica de los conos de

crecimiento que disminuye al sobreexpresar Gpm6a silvestre. Esto nos lleva a pensar que mayores niveles de Gpm6a estabilizan los conos de crecimiento en progenitores neuronales. En progenitores neuronales que no expresan CHRFAM7A (línea UB068) no observamos un aumento en la estabilidad de los conos de crecimiento al sobreexpresar Gpm6a silvestre. A su vez, esta línea es la única donde observamos que la sobreexpresión del mutante E258A inhibe la extensión de neuritas. La sobreexpresión de E258A en progenitores neuronales que expresan CHRFAM7A_Δ2BP resulta en una reducción en la formación de filopodios. La presencia del CHRFAM7A en forma invertida en el estadio de progenitores neuronales coincide con el aumento en la expresión de GPM6A.

En resumen, hemos demostrado que el residuo E258 de Gpm6a es crítico para la formación de filopodios y su sustitución afecta el tráfico intracelular de Gpm6a. Gpm6a está implicada en la diferenciación neuronal de las iPSCs humanas, y su expresión se ve afectada en el contexto de la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave

- Glicoproteína Gpm6a
- Diferenciación neuronal
- Tráfico intracelular
- Enfermedad de Alzheimer
- Células madre pluripotentes inducidas iPSCs
- Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$

ABSTRACT

The neuronal membrane glycoprotein Gpm6a belongs to the proteolipid family of proteins and is abundantly expressed in neurons of the central nervous system. The role of Gpm6a in the central nervous system is still not fully understood, but there is evidence of its participation in neuronal differentiation and development, being important for filopodia formation, neurite outgrowth, and synaptogenesis. From previous results from our laboratory, we know that Gpm6a induces filopodia formation, however, the mechanism by which Gpm6a exerts its function is currently unknown.

In the present work we identified residues K250, K255 and E258 at the C-terminus as crucial for this function, since their mutations resulted in an inhibition in the formation of filopodia in hippocampal neurons. In particular, the substitution of E258 to alanine demonstrated an increase in the cytoplasmic accumulation of Gpm6a, greater colocalization with Lamp1-positive structures, lower expression and less presence on the cell surface suggesting that the substitution of this residue affects the intracellular trafficking of Gpm6a than contributes to its neuroplastic function.

In humans, alterations in the expression levels and in the sequence of GPM6A have been associated with different neuropsychiatric pathologies, including Alzheimer's disease. Furthermore, Gpm6a has been shown to be involved in the differentiation of human embryonic pluripotent stem cells. In this work we use a human induced pluripotent stem cell (iPSCs) model to demonstrate that GPM6A expression is decreased in neuronal progenitors and in differentiated neurons from cell lines derived from people diagnosed with Alzheimer's. It should be noted that its expression is lower in the UB068 cell line, which coincides with the presence of the APOE4 allele, the main risk factor for developing AD.

On the other hand, we demonstrated that in iPSC cell lines the expression of GPM6A varies depending on the presence of the CHRFAM7A fusion gene. CHRFAM7A is a uniquely human gene that modulates the activity of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) which has a key role in Alzheimer's disease, altering the flow of intracellular Ca^{2+} and the uptake of β -amyloid by the $\alpha 7$ receptor. There are three alleles for this gene in the population: the ancestral allele lacking the fusion gene (0 copies, 1% of the human population), the fusion gene in forward orientation (CHRFAM7A), and the fusion gene in reverse orientation with a 2 base pair deletion in exon 6 (CHRFAM7A $\Delta 2\text{bp}$) that regulate the $\alpha 7$ receptor differently.

Using isogenic lines, we observed that the direct presence of the CHRFAM7A fusion gene has a dual effect on the expression of GPM6A depending on the stage of development. In neurons, the presence of the CHRFAM7A fusion gene in the direct form correlates with greater expression of GPM6A and coincides with greater differentiation of neurons derived from iPSCs showing an increase in the proportion of dendritic spines and in the length of neuronal processes.

In neuronal progenitors with the direct CHRFAM7A fusion gene, the expression of GPM6A is lower. When analyzing the morphology of the cells, we observed that low expression of Gpm6a coincides with a lack of neuronal differentiation and shorter neurites. However, overexpression of exogenous wild-type or E258A non-functional mutant GPM6A does not cause any effect on neurite outgrowth in neuronal progenitors of this line. On the other hand, we observed a greater dynamic of the growth cones that decreases when wild type Gpm6a is overexpressed. This leads us to think that higher levels of Gpm6a stabilize growth cones in neuronal progenitors. In neuronal progenitors that do not express CHRFAM7A (line UB068) we did not observe an increase in the stability of the growth cones when overexpressing wild-type Gpm6a. In turn, this line is

the only one where we observed that overexpression of the E258A mutant inhibits neurite outgrowth. Overexpression of E258A in neuronal progenitors expressing CHRFAM7A_Δ2BP results in a reduction in filopodia formation. The presence of CHRFAM7A in the inverted form in the neuronal progenitors stage coincides with the increase in the expression of GPM6A.

In summary, we have shown that the E258 residue of Gpm6a is critical for filopodia formation and its substitution affects the intracellular trafficking of Gpm6a. Gpm6a is involved in the neuronal differentiation of human iPSCs, and its expression is affected in the context of Alzheimer's disease.

Keywords

- Glycoprotein Gpm6a
- Neural differentiation
- Intracellular traffic
- Alzheimer disease
- Induced pluripotent stem cells iPSCs
- $\alpha 7$ nicotinic ccetylcholine Receptor