



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Análisis molecular de la interacción anosmina-1/FGFR1 y efectos de la sobreexpresión de anosmina-1 en el sistema nervioso central

Verónica Murcia Belmonte



Tesis

**Doctorales**

[www.eltallerdigital.com](http://www.eltallerdigital.com)

UNIVERSIDAD de ALICANTE





HOSPITAL  
NACIONAL DE  
PARAPLÉJICOS  
*Toledo*

sescam  
Servicio de Salud de Castilla-La Mancha



**Análisis molecular de la interacción  
anosmina-1/FGFR1 y efectos  
de la sobreexpresión de anosmina-1  
en el sistema nervioso central**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por  
Verónica Murcia Belmonte



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





HOSPITAL  
NACIONAL DE  
PARAPLÉJICOS  
Toledo

sescam  
Servicio de Salud de Castilla-La Mancha



Fundación del  
Hospital Nacional  
de Paraplégicos  
para la Investigación  
y la Integración



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

D. Fernando de Castro Soubriet, Investigador Principal del Grupo de Neurobiología del Desarrollo y D. Pedro Felipe Esteban Ruiz, Investigador Postdoctoral del Grupo de Neurobiología del Desarrollo,

AUTORIZAN la presentación de la Tesis Doctoral titulada: "**Análisis molecular de la interacción anosmina-1/FGFR1 y efectos de la sobreexpresión de anosmina-1 en el sistema nervioso central**", realizada por la Lda. **Verónica Murcia Belmonte**, bajo nuestra dirección y supervisión en el Hospital Nacional de Paraplégicos (HNP) y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Alicante.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, firmamos la presente autorización en Toledo, a 11 de enero de dos mil trece.

Fdo.: Fernando de Castro Soubriet

Fdo.: Pedro Felipe Esteban Ruiz





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

***AGRADECIMIENTOS***



Son muchas las personas con las que me he cruzado hasta llegar aquí, y cada una de ellas aportó algo que me ha hecho aprender cada día un poquito más.

En primer lugar, quiero agradecerles a mis directores de tesis, el Dr. Fernando de Castro Soubriet por darme la oportunidad de aprender y madurar científicamente en su laboratorio, alentándome a aprender todo tipo de técnicas durante esta tesis; y al Dr. Pedro F. Esteban, por guiarme en cada experimento que he realizado. Gracias por vuestra confianza.

A todos mis compañeros del Grupo de Neurobiología del desarrollo (GNDe), los que están y los que, aunque se hayan ido, siempre me acompañarán: Pedro Esteban, Diego Clemente, Virginia Vila, Javier Arenzana, Ana Bribián, Diego García, Cristina Ortega, Verónica Moliné, Eva Medina, Isabel Machín, Laura García, Rafael Lebrón, Iris Sánchez y Jacinto Sarmentero. Gracias por aguantar mis enfados, agobios y exigencias.

A los postdoc de GNDe, porque me he hecho mayor gracias a vosotros. Gracias por vuestra paciencia y vuestros consejos. De nuevo a Pedro, por tener una respuesta para todo y porque nuestros experimentos, aunque nadie los entienda, son los mejores. A Diego Clemente, porque contigo hemos pasado momentos inolvidables en la nave modular. A Ana Bribián, la maldad original, fue un placer ocupar el número 2 en el ranking de maldad. A Virginia y a Javi Arenzana, ambos dispuestos a escuchar nuestras dudas en cualquier momento, siempre seréis parte de GNDe.

A Cris, por convivir conmigo en la esquina de la muerte del laboratorio y por "secuestrarme" cuando lo he necesitado. A Diego, el calamar de Getafe, por tu alegría y por los experimentos de tarde del "olfactory team". He aprendido mucho contigo y de ti. Vero Moliné (Vero3), nos trajiste ese aire andaluz con el que corres por todo laboratorio, y a Eva, por compartir conmigo el mundo del OPC, con sus alegrías y sus penas. He tenido mucha suerte por conoceros y compartir estos años de tesis-sufrimiento-alegría con vosotros.

Gracias a Isa, por ser mi amiga (y mi pareja de día), mi compi de inglés, la reina del cultivo de OPCs, la sonrisa de GNDe y por cuidarme tanto durante estos años. A Rafa, gracias a ti mi estrés disminuyó, un poco, cuando llegaste a GNDe. No te puedes imaginar lo que me has ayudado. A Iris, porque aunque no te manifiestes mucho, cuando lo haces, la nave modular se tambalea y me encanta; y a Jacinto, por ser una de las pocas personas que piensa bien de todo y de todos. Me habéis ayudado muchísimo y ojalá pudiera teneros siempre cerca porque sois geniales. Os voy a extrañar muchísimo.



La estancia en la División de Neurociencias de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla ha sido un periodo al que guardo especial cariño. Tengo que agradecer al profesor José María Delgado y a la Dra. Agnès Gruart por abrirme las puertas de su laboratorio. A Germán, por explicarme cómo analizar los registros de electrofisiología, y por sacarme de la UPO después de esos días interminables dentro del animalario. Y como no, a Jose y María, porque habéis cuidado de mi y me habéis hecho sentir como en casa cada vez que he ido a Sevilla.

El paso por el Instituto de Neurociencias de Alicante fue una gran experiencia a nivel personal y profesional para mí. Gracias a Francisco Castelán, por ser mi psicólogo y por ayudarme a entender la biología molecular; a Marcos Aldea, por hacerme reír en los momentos difíciles; y a Mar Castillo, por tus palabras de ánimo que han hecho que me esforzase cada día más. A Inma y Pep, por escucharme, apoyarme y estar pendientes de mí tantas veces, os eché mucho de menos cuando me fui; y a Mar Francés, porque ojalá hubiese tenido una técnico y amiga como tú en el laboratorio 117. A Vanesa, Bernal y José Antonio Ortiz, fue un verdadero placer conocerlos y compartir tantos ratos con vosotros, y sobre todo por darme ánimos para seguir en este mundo.

A Marina, Alfonso, Ana, Carol, M<sup>a</sup> José, Gema, Susi y Eva, porque los años de universidad es una de las etapas más bonitas de la vida y la compartí con vosotros. Las clases y las prácticas en la UA nunca se borrarán de mi memoria.

A mi familia, porque he crecido a vuestro lado y me habéis querido tal y como soy. A mis padres, Antonio y Monse, por creer en mí y estar siempre a mi lado en cada paso; y a mi hermano Antonio, porque fuiste mi regalo y has estado conmigo, día tras día. Estoy muy orgullosa de ti. A Inés y Mayte porque, además de primas, sois mis amigas y habéis estado ahí a pesar de la distancia.

Y por supuesto, a Andrés, por todo lo que hemos aprendido y compartido desde que empezamos nuestra vida juntos. Por cuidarme y quererme como nadie lo ha hecho nunca.

Para finalizar, no quiero dejar de recordar a otras muchas personas de la Unidad de Investigación del Hospital Nacional de Parapléjicos que han sido importantes colaboradores en la realización de este trabajo.

A todos, muchas gracias.







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

*"Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro"*

René Descartes

*"Mi felicidad consiste en que sé apreciar lo que tengo  
y no deseo en exceso lo que no tengo"*

León Tolstói





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

*A mis padres y a mi hermano*

*A Andrés*







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

***ABREVIATURAS***



## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribunucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribunucleico complementario

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**BO:** Bulbo olfativo

**CC:** Cuerpo calloso

**CoIP:** Coinmunoprecipitación

**DG:** Giro dentado

**DiV:** Días *in vitro*

**ECM:** Matriz extracelular

**EGFP:** Proteína fluorescente verde

**EM:** Esclerosis Múltiple

**FBS:** Suero fetal bovino

**FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico

**FGFR:** Receptor del factor de crecimiento fibroblástico

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas

**GSTpd:** GST pull-down

**HH:** Hipogonadismo hipogonadotrópico

**HS:** Heparán sulfatos

**IHH:** Hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático

**KS:** Síndrome de Kallmann

**MBP:** Proteína básica de la mielina

**ME:** microcopía electrónica

**PB:** Tampón fosfato

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PDGFR $\alpha$ :** Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alpha

**OLs:** Oligodendrocitos

**OPCs:** Precursores de oligodendrocitos

**SNC:** Sistema nervioso central

**SNP:** Sistema nervioso periférico

**SPR:** Resonancia del plasmón de superficie

**SVZ:** Zona subventricular

**VEGF:** Factor de crecimiento vascular

**VL:** Ventrículo lateral





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**ÍNDICE**





<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. El Síndrome de Kallmann .....</b>	<b>3</b>
1.1. Anosmina-1.....	5
1.2. Expresión del gen <i>KAL1</i> y anosmina-1.....	6
1.3. Implicaciones de la proteína anosmina-1 en el desarrollo del SNC.....	7
1.3.1. La matriz extracelular.....	7
1.3.2. Efectos biológicos de la proteína anosmina-1 .....	8
1.3.3. Mecanismo de acción de la proteína anosmina-1 .....	9
1.4. Sintomatología del Síndrome de Kallmann.....	12
<b>2. Desarrollo de la corteza cerebral.....</b>	<b>13</b>
2.1. Oligodendrogliogénesis.....	14
2.2. Migración y diferenciación de los OPCs .....	15
2.3. Mielinización del SNC.....	18
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 1.- Análisis de la interacción anosmina-1/FGFR1 y otros componentes de la matriz extracelular .....</b>	<b>31</b>
1.1. Biochemical dissection of Anosmin-1 interaction with FGFR1 and components of the extracellular matrix.....	33
1.2. The cysteine-rich region and the whey acidic protein domain are essential for anosmin-1 biological functions.....	45
<b>CAPÍTULO 2.- Caracterización de una línea de ratón transgénico que sobreexpresa la proteína anosmina-1 .....</b>	<b>61</b>
2.1. Material y Métodos.....	63
2.1.1. Generación de una línea de ratón transgénico que sobreexpresa anosmina-1.....	63
2.1.2. Histología .....	64
2.1.3. Cultivo celular .....	65
2.1.4. Análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real.....	67
2.1.5. Análisis de la expresión de proteínas mediante <i>Western blot</i> .....	67
2.1.6. Microscopía electrónica.....	68
2.1.7. Análisis electrofisiológico de la velocidad de conducción de los axones del cuerpo calloso .....	68
2.1.8. Análisis cuantitativo y estadístico.....	69
2.2. Resultados .....	71
2.2.1. Generación de la línea de ratón transgénico que sobreexpresa anosmina-1 .....	71
2.2.2. La sobreexpresión de anosmina-1 incrementa el número de OPCs.....	72

2.2.3. La sobreexpresión de anosmina-1 contribuye a la migración y diferenciación de los OPCs <i>in vitro</i> .....	75
2.2.4. Anosmina-1 incrementa la expresión de la proteína MBP y el grosor de la vaina de mielina en los axones del cuerpo calloso.....	77
2.2.5. La sobreexpresión de anosmina-1 modifica la longitud nodal y la velocidad de conducción de los axones del cuerpo calloso .....	79

**DISCUSIÓN .....83**

1. Interacción entre anosmina-1 con el receptor FGFR1 .....	85
2. Efecto de anosmina-1 y sus mutantes en la migración de los neuroblastos de la SVZ vía FGFR1 .....	88
3. Activación de la vía de señalización intracelular ERK MAPK en el efecto quimiotrópico de FGF2/anosmina-1 .....	91
4. Interacción entre anosmina-1 y diferentes moléculas de la ECM .....	92
5. Anosmina-1 promueve la proliferación y migración de los OPCs que se originan en la SVZ.....	93
6. La sobreexpresión de anosmina-1 aumenta el número de OLS maduros incrementando la mielinización de los axones del cuerpo calloso.....	95
7. Anosmina-1: posibles implicaciones patológicas y terapéuticas en el SNC.....	99

**CONCLUSIONES ..... 101**

**BIBLIOGRAFÍA ..... 105**







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## ***INTRODUCCIÓN***





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 1. EL SÍNDROME DE KALLMANN

El anatomista español Aureliano Maestre de San Juan constató la ausencia de estructuras olfativas en el cerebro junto a hipogonadismo, en la autopsia de un cadáver en 1856 (Maestre de San Juan 1856), pero fue casi un siglo después cuando, en 1944, el Síndrome de Kallmann (KS) fue definido por el genetista y psiquiatra Franz Josef Kallmann, quien amplió la descripción a tres familias afectadas por la presencia conjunta de pérdida del sentido del olfato (anosmia) e hipogonadismo (Kallmann et al. 1944). En 1954, de Morsier describió la relación entre la ausencia de bulbos y tractos olfativos en varones con el hipogonadismo (de Morsier 1954; de Morsier y Gauthier 1963) y, años más tarde, el hipogonadismo fue adscrito a un fallo en la migración de las neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que no consiguen entrar en el telencéfalo y llegar al hipotálamo (Schwanzel-Fukuda et al. 1989; Wray et al. 1989). Este fallo en la migración de las neuronas GnRH repercute en el funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisiario, no se produce la liberación de la GnRH, que estimula la correcta secreción de las hormonas gonadotropinas, LH y FSH, producidas por la adenohipófisis e indispensables para la función gonadal y reproductiva (Naftolin et al. 1971).

El KS combina el hipogonadismo hipogonadotrópico (HH) con diferentes grados de anosmia. La anosmia se ha relacionado con la ausencia o hipoplasia de los tractos olfativos y los bulbos olfativos (BO); mientras que el hipogonadismo se corresponde con una disminución en los niveles de hormonas sexuales (testosterona en caso de los hombres, y estrógenos y progesterona en las mujeres) y, como consecuencia, la ausencia de maduración sexual en los pacientes con KS.

Varios genes relacionados con el KS han sido identificados hasta la fecha, entre ellos *KAL1*, *KAL2*, *FGF8*, *PROKR2*, *PROK2*, *SEMA3A*, *CHD7*, *NELF* y *HS6ST1* (Laitinen et al. 2012; Vaaralahti et al. 2012; Hardelin y Dodé 2008; Martin et al. 2011). El gen *KAL1* codifica para la proteína anosmina-1, responsable del modo de herencia de la enfermedad ligada al cromosoma X (X-KS). La heterogeneidad clínica en los pacientes con X-KS, incluso entre familiares, sugiere la implicación de diversos factores genéticos todavía desconocidos. La incidencia de la enfermedad ha sido estimada en 1 de cada 8.000 varones y en 1 de cada 40.000 mujeres (Dodé y Hardelin 2009). El gen *KAL1* comprende 14 exones y está localizado en la región Xp22.3 del cromosoma X. El hecho de que un alelo inactivo de este gen haya sido descrito en el cromosoma Y (del Castillo et al. 1992), junto con que este gen escapa parcialmente a la inactivación del cromosoma X, podría explicar la alta prevalencia de la enfermedad en los hombres (Dodé et al. 2003; Laitinen et al. 2011).

El gen *KAL2*, codifica para el receptor del factor de crecimiento fibroblástico tipo 1 (FGFR1), responsable de la forma autosómica dominante del KS (Franco et al. 1991; Dodé et al. 2003). Las mutaciones descritas en este gen indican que FGFR1 está implicado en la migración de las neuronas GnRH, aunque otros factores todavía no descritos podrían estar involucrados, ya que existen individuos con el gen *KAL2* mutado que presentan una

deficiencia en GnRH y normosmia (Martin et al. 2011). A este respecto, ha sido publicado recientemente que la vía de señalización intracelular fosfatidilinositol 3-quinasa activada por FGFR1 es necesaria para la migración de las neuronas GnRH y la formación del BO en pollo (Hu et al. 2012).

Mutaciones en el gen *FGF8* dan lugar a una deficiencia de la señalización intracelular a través de FGFR1, indispensable para el funcionamiento del sistema GnRH (Chung et al. 2008). Tanto la prokinetina 2, como su receptor PROKR2, parecen estar implicados en el KS. De hecho, el análisis de líneas de ratones mutantes para *Prokr2* y *Prokr2* reveló defectos tanto en el desarrollo del BO, debido a la reducción de la migración de las neuronas generadas en la zona subventricular (SVZ) y que migran a través de la corriente migratoria rostral para integrarse en el BO, como en la maduración sexual (Matsumoto et al. 2006; Ng et al. 2005; Prosser et al. 2007). La identificación de mutaciones en estos genes en pacientes afectados de KS, ha hecho que se proponga a la proteína anosmina-1 como reguladora de la señalización de PROK2 a través de PROKR2 (Dodé et al. 2006; Martin et al. 2011; Monnier et al. 2009).

Dos recientes estudios han puesto de relieve la importancia de moléculas de guía axonal, como las semaforinas, en este sistema. La molécula sema4D promueve la migración de las neuronas GnRH (Giacobini et al. 2008), mientras que neuropilina 2 (NRP), conocido como receptor para sema3F, ayuda a la organización de los axones olfativos y vomeronasales que son utilizados por las neuronas GnRH para migrar (Cariboni et al. 2007). Mediante el estudio de dos líneas de ratones mutantes, una carente de sema3A y otra carente de la señalización de semaforinas a través de ambas neuropilinas (NRP1 y NRP2), se ha demostrado que la señalización a través de la molécula sema3F no es esencial para la migración de las neuronas GnRH, mientras que la señalización a través de sema3A sí lo es para la regulación de la reproducción sexual (Cariboni et al. 2011). Además, ambas líneas de ratones mutantes muestran características fenotípicas similares a las observadas en un feto con KS (Schwanzel-Fukuda et al. 1989). Estos datos han suscitado la sospecha de que defectos en componentes de la vía de sema3A dan también lugar al KS, hecho que ha sido confirmado recientemente (Hanchate et al. 2012; Young et al. 2012).

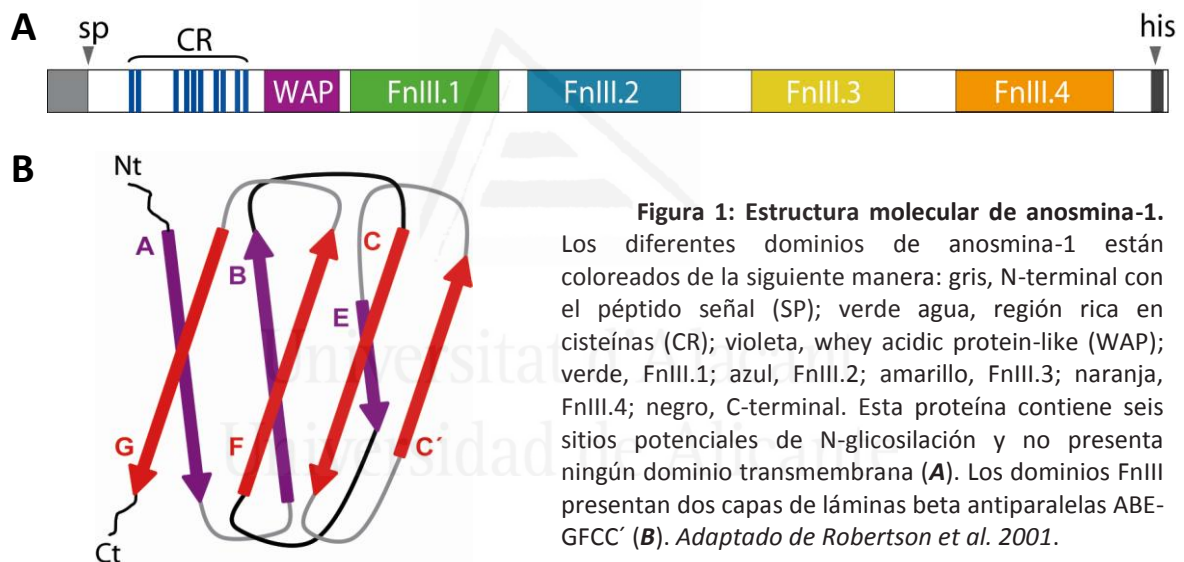
Tanto la anosmia como el HH son frecuentes en el síndrome de CHARGE causado por mutaciones en el gen *CHD7*, por lo que este gen ha sido considerado como uno de los genes implicados en el KS (Bergman et al. 2012; Jongmans et al. 2009). También, se ha descubierto que el gen *NELF* está asociado con el HH idiopático (IHH) y con el KS (Xu et al. 2011). Mutaciones en el gen *HS6ST1*, identificadas en pacientes con IHH, reducen la actividad de la proteína que codifica; estas mutaciones tienen distintos efectos en ensayos dependientes de *KAL1*, por lo que el gen *HS6ST1* podría estar implicado en las vías en las que interviene *KAL1* (Tornberg et al. 2011).

El modo de herencia ligado al cromosoma X es relativamente infrecuente, indicando la existencia de una heterogeneidad genética, que complica el diagnóstico genético de la enfermedad. Todavía podrían existir genes sin identificar cuyos defectos

darían lugar a fenotipos similares caracterizados por una deficiencia de las neuronas GnRH con o sin anosmia.

### 1.1 Anosmina-1

El gen *KAL1* codifica la proteína anosmina-1, una glicoproteína de la matriz extracelular (ECM) de 680 aminoácidos y con un peso molecular aproximadamente de 100 kDa (SwissProt P23352). Está compuesta por varios dominios, incluyendo: una zona rica en cisteínas (CR) en la región N-terminal, un dominio WAP (del inglés "whey acidic protein-like"), similar a los presentes en proteínas con actividad inhibidora de serín proteasas, cuatro repeticiones consecutivas FnIII ("Fibronectin-like type III"), los cuales se encuentran en diferentes proteínas implicadas en adhesión celular como NCAMs, TAG1 o L1 (Brümmendorf y Rathjen 1993; Franco et al. 1991; Legouis et al. 1993), y una región C-terminal rica en histidinas y residuos básicos (del Castillo et al. 1992; Lutz et al. 1994; Rugarli et al. 1996; Soussi-Yanicostas et al. 1996).



La secuencia de anosmina-1 está altamente conservada entre especies, desde *C. elegans* hasta primates, incluyendo roedores como la ardilla (*Spermophilus tridecemlineatus*) y el cobaya (*Cavia porcellus*), aunque un ortólogo en rata y ratón todavía no ha sido identificado. De hecho, el gen *KAL1* humano se localiza en una región del cromosoma X (Xp22.3), adyacente a la región pseudoautosómica PAR1, una zona de alta variabilidad (Graves et al. 1998; Shapiro et al. 1979; Yen et al. 1992; Soussi-Yanicostas et al. 2002). Esta región fue eliminada o reubicada en otros cromosomas en un ancestro común de rata o ratón (Ross et al. 2005). Mientras la adición de genes a la región PAR1 desde otros cromosomas ha tenido lugar en los animales placentarios, así como en monotremas y marsupiales macropódidos, la pérdida de genes de la región PAR1 es evidente en el cromosoma X del ratón (Mangs y Morris 2007).



La expresión del gen *KAL1* en otras especies como el pollo o el pez cebra ha sido observada en la capa de las células mitrales del BO, el tracto olfativo lateral y la corteza olfativa piriforme (Ayari y Soussi-Yanicostas 2007; Ayari et al. 2012; Dellovade et al. 2003; Soussi-Yanicostas et al. 2002; Yanicostas et al. 2009; Ardouin et al. 2000). Su expresión también se ha descrito en el cerebelo de especies como el pollo, la musaraña y el pez cebra, concretamente en las células de Purkinje, en neuronas de proyección de los núcleos profundos del cerebelo y en la capa granular interna (Ardouin et al. 2000; Ayari et al. 2012; Dellovade et al. 2003; Legouis et al. 1993; Rugarli et al. 1993; Soussi-Yanicostas et al. 1996; Soussi-Yanicostas et al. 2002). Nuestro grupo ha descrito el patrón de expresión de la proteína anosmina-1 en el SNC de la rata durante el desarrollo, principalmente en neuronas, aunque también en células gliales del fórnix, el cuerpo calloso y la comisura anterior durante estados postnatales; en células del epitelio olfativo, órgano vomeronasal, hipotálamo, sistema visual, corteza motora y en la capa piramidal del hipocampo, así como en las células de Purkinje del cerebelo (Clemente et al. 2008; Gianola et al. 2009)

Fuera del SNC, el gen *KAL1* también se expresa en músculo, capa basal de la piel, células del endotelio vascular, fibroblastos y queratinocitos humanos (Raju y Dalakas 2005; Tengara et al. 2010). Su expresión en estas células se ve disminuida en las pieles atópicas modulando la densidad de las fibras nerviosas epidérmicas (Tengara et al. 2010). También está presente en las células germinales durante la espermatogénesis, así como en las células de la granulosa y en los oocitos del ualabí, un marsupial de la familia Macropodidae, por lo que anosmina-1 podría tener un papel en la regulación de la espermatogénesis y la foliculogénesis en las gónadas (Hu et al. 2011).

La regulación y control de la expresión del gen *KAL1* todavía no se conoce en profundidad. Sin embargo, en diferentes tumores, líneas celulares y en ciertos desórdenes inflamatorios se ha observado una regulación de la expresión de *KAL1*, sugiriendo que anosmina-1 puede tener un papel en la patogenia de estas enfermedades. Factores como la hipoxia, la metilación de islas CpG en el promotor del gen y moléculas implicadas en procesos inflamatorios, pueden participar en la regulación de la expresión del gen *KAL1* (Arikawa et al. 2011; Jian et al. 2009; Kawamata et al. 2003; Mihara et al. 2006; Raju y Dalakas 2005; Tengara et al. 2010).

### **1.3 Implicaciones de la proteína anosmina-1 en el desarrollo del SNC**

#### **1.3.1 La matriz extracelular**

El genoma de mamíferos codifica un amplio repertorio de glicoproteínas de la ECM que afectan al desarrollo y la función del sistema nervioso, incluyendo la migración neuronal. La ECM proporciona soporte estructural a las células, regula la actividad de segundos mensajeros y controla la distribución y concentración de factores de crecimiento y de diferenciación (Kim et al. 2011). La función más conocida de la ECM es



su papel como sustrato sobre el cual las células pueden migrar. Las glicoproteínas de la ECM promueven diferentes modos de migración neuronal que se distinguen de acuerdo con las rutas de migración seguidas por las células y por cómo interaccionan estas células durante su migración. Los modos de migración mejor descritos son la migración radial, tangencial y la migración en cadena. La migración de las células en el cerebro desde su origen hasta su destino final, donde se diferencian e integran en circuitos neuronales, es fundamental para el correcto desarrollo del sistema nervioso. Las neuronas a menudo cambian entre los distintos tipos de migración sugiriendo que además de mecanismos intrínsecos a la célula, las señales extracelulares pueden ser determinantes en la elección de un tipo particular de migración (Franco y Muller 2011; Marín y Rubenstein 2003).

En el SNC, las neuronas migran a través de regiones ricas en glicoproteínas de la ECM, indicando que la ECM puede desempeñar un importante papel en la regulación de la migración celular. Mutaciones en las glicoproteínas de la ECM pueden alterar el posicionamiento neuronal por mecanismos extrínsecos que, de manera secundaria, afectan a la migración de las neuronas (Franco y Muller 2011).

### **1.3.2 Efectos biológicos de la proteína anosmina-1**

Anosmina-1 es una proteína de la ECM y como tal está implicada en la migración y en la adhesión celular de varios tipos celulares en el SNC. Anosmina-1 tiene un efecto quimioatrayente para una línea celular inmortalizada de neuronas GnRH de origen humano (GN11). Esta proteína es capaz de unirse a la superficie de las células GN11 mediante la interacción con heparán sulfatos (HS), donde el bloqueo de esta unión con heparina o el pretratamiento con heparitinasa anula el efecto quimiotáctico ejercido por anosmina-1 sobre estas células. El efecto biológico de anosmina-1 sobre las células GN11 también es suprimido cuando la proteína contiene algunas de las mutaciones halladas en pacientes de KS (Cariboni et al. 2004).

El mismo efecto quimiotrópico, mediado por FGFR1, es observado sobre los neuroblastos que migran desde su lugar de origen en el telencéfalo, la SVZ, por la corriente migratoria rostral hasta el BO. Anosmina-1 influye sobre la dirección de migración de los neuroblastos, pero no tiene un efecto motogénico y mitogénico como el que presenta FGF2 (García-González et al. 2010). La actividad motogénica y la dirección de migración pueden estar reguladas por interacciones con otras señales intra o extracelulares, lo cual implica que estas actividades son dependientes del ambiente en el que se encuentra la célula (Garzotto et al. 2008; Hu et al. 2001; Mason et al. 2000; Paratcha et al. 2006).

FGF2 también es motogénico para los precursores de oligodendrocitos (OPCs) del nervio óptico de ratón, mientras que la interacción de anosmina-1 con el complejo FGFR1/FGF2 limita la movilidad de estas células sin influir en la dirección de la migración (Bribián et al. 2006). Este efecto está relacionado con la adhesión celular, ya que anosmina-1 aumenta la adhesión de los OPCs reduciendo la motilidad celular, en

comparación con otros sustratos como laminina y fibronectina. La expresión endógena de anosmina-1 es necesaria para la correcta adhesión de estas células a diferentes componentes de la ECM, contribuyendo a la migración de las mismas, puesto que el bloqueo de anosmina-1 endógena disminuye la capacidad de migración de los OPCs (Bribián et al. 2008). En este sentido, se ha descrito que anosmina-1 y FGF2 se encuentran expresados selectivamente en las distintas lesiones de esclerosis múltiple y que desarrollan un papel importante en la migración de OLs (Clemente et al. 2011).

La proteína anosmina-1 participa en el desarrollo del sistema olfativo controlando el crecimiento de neuritas y la formación de colaterales axónicas de las neuronas mitrales y empenachadas del BO (Bülow et al. 2002; Rugarli et al. 2002; Soussi-Yanicostas et al. 1998; Soussi-Yanicostas et al. 2002; Yanicostas et al. 2009), así como en la elongación de neuritas y colaterales axónicas en las células de Purkinje del cerebelo, promoviendo su regeneración después de una lesión (Gianola et al. 2009). Además, en una línea celular derivada de neuroblastos del epitelio olfativo humano (FNC-B4), anosmina-1 induce crecimiento de neuritas y una reorganización del citoesqueleto a través de mecanismos dependientes de FGFR1 (González-Martínez et al. 2004).

En el pez cebra se han encontrado dos ortólogos para el gen *KAL1* denominados, *kal1a* y *kal1b*, que codifican para anosmina 1a y 1b, respectivamente, mostrando distintos patrones de expresión durante el desarrollo. En el sistema olfativo del pez cebra, la inactivación de *kal1a* impide la llegada de los axones olfativos a su destino final en el BO provocando una disminución del número de neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas en esta estructura (Yanicostas et al. 2009) y sólo anosmina 1a es esencial para la migración de las neuronas GnRH en el pez cebra (Whitlock et al. 2005).

Las moléculas de la ECM tienen un papel importante en la morfogénesis y en la diferenciación de las células madre (Engler et al. 2006; Sakai et al. 2003; Wang et al. 2008). Recientemente, se ha demostrado que anosmina-1 está implicada en la formación de la cresta neural, regulando la expresión y actividad de factores de crecimiento como FGF8 y BMP5, mientras que inhibe la expresión de WNT3a (Endo et al. 2012), todos ellos morfógenos determinantes para el desarrollo del sistema nervioso.

### 1.3.3 Mecanismo de acción de la proteína anosmina-1

Aunque los mecanismos de acción de anosmina-1 no se conocen completamente, se ha propuesto su interacción con diferentes componentes de la ECM, así como con receptores de membrana. Por ejemplo, la interacción con HS presentes en la ECM es importante para la localización y la unión de anosmina-1 a dicha ECM (Hu et al. 2004; Rugarli et al. 1996; Soussi-Yanicostas et al. 1996; Soussi-Yanicostas et al. 1998) y al menos cinco motivos de unión a HS han sido descritos en esta proteína (Robertson et al. 2001). Los HS parecen ser necesarios para la actividad biológica de anosmina-1 (Bülow et al. 2002; Bülow y Hobert 2004; Cariboni et al. 2004; González-Martínez et al. 2004) y, de hecho en *C. elegans*, la interacción entre la proteína anosmina-1 con sindecano-1 y



glipicano-1 controla la migración de los neuroblastos durante el desarrollo embrionario (Hudson et al. 2006). Además, este mismo modelo en mutantes de *C.elegans*, el crecimiento axonal inducido por anosmina-1 es suprimido cuando estos organismos son deficientes en heparan-O-sulfotransferasa y C5-epimerasa (Bülow y Hobert 2004).

Se ha demostrado, mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (CoIP) y resonancia de plasmón de superficie (SPR), la interacción directa del activador de plasminógeno tipo urokinasa (uPA) con anosmina-1, que aumenta la actividad proteolítica de uPA *in vitro* (Hu et al. 2004).

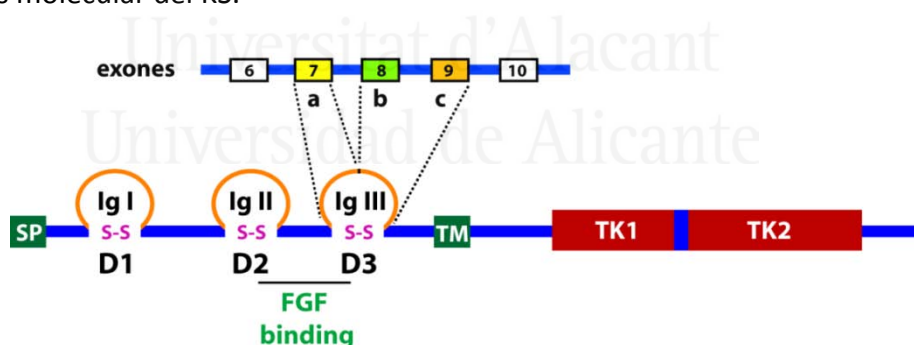
Posibles interacciones homofílicas entre anosmina-1 y la interacción con otras proteínas de la ECM, como fibronectina y laminina, han sido demostradas previamente por nuestro grupo (Bribián et al. 2008). Como ya se ha comentado anteriormente la implicación de prokineticina 2 y su receptor Prokr2 en el KS plantea la hipótesis de que anosmina-1 podría modular la actividad de estas moléculas, al igual que ocurre con FGFR1 (Dodé et al. 2006; Hardelin y Dodé 2008).

El mecanismo de acción de anosmina-1 mejor conocido es su interacción con el receptor FGFR1 y la modulación de la activación de este receptor por FGF2 (Ayari y Soussi-Yanicostas 2007; Bribián et al. 2006; Dodé et al. 2003; García-González et al. 2010; González-Martínez et al. 2004; Hu et al. 2009). De hecho, la interacción entre estas dos proteínas ha sido descrita por CoIP (Ayari y Soussi-Yanicostas 2007; Bribián et al. 2006; González-Martínez et al. 2004) y, mediante SPR se ha demostrado que la región N-terminal de anosmina-1 (que comprende los dominios CR, WAP y el primer dominio FnIII) interacciona con los dominios extracelulares D2 y D3 del receptor FGFR1 (Hu et al. 2009).

Los receptores FGFRs pertenecen a la superfamilia de receptores tirosina kinasa compuesta por 5 miembros (FGFR1-5) que contienen un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio tirosina kinasa intracelular (Ornitz et al. 1996). El ligando prototipo del receptor FGFR1 es uno de los componentes de la familia de los FGFs, el FGF2. Los HS secretados por las células son esenciales para la correcta interacción y estabilización del complejo FGF/FGFR (Guimond y Turnbull 1999). En la formación del complejo FGF/FGFR/HS, en primer lugar, se produce la unión FGF/FGFR, que permite la dimerización del receptor. Los HS estabilizan este complejo y permiten la unión de una segunda molécula de FGF (Ornitz 2000). En la secuencia de anosmina-1 existen cinco motivos de unión a HS, que son importantes para la localización y la unión de anosmina-1 a la ECM a través de su interacción con los HS (Hu et al. 2004; Robertson et al. 2001; Rugarli et al. 1996; Soussi-Yanicostas et al. 1996). Tanto anosmina-1 como FGFR1 requieren de los HS para sus funciones biológicas. De hecho, algunos autores sugieren que anosmina-1 regula la señalización de FGFR1 a través de su interacción dependiente de HS (González-Martínez et al. 2004). Se ha hipotetizado que, debido a su naturaleza difusible, anosmina-1 intervendría en la dinámica de unión del complejo FGF2-FGFR1-HS. La interacción anosmina-1/HS para unirse después con FGF2/FGFR1 facilitaría la señalización del complejo FGF2-FGFR1-HS. Si los niveles de anosmina-1 son elevados, anosmina-1 no se uniría a los HS y podría difundir libremente por la superficie de la célula,

obstaculizando la formación del complejo FGF2-FGFR1-HS (Hu et al. 2009). A esto hay que añadir que, recientemente, se ha demostrado que anosmina-1 interacciona con FGF8 promoviendo la formación del complejo FGF8/FGFR1 (Endo et al. 2012).

Una característica importante de la familia FGFR es la gran variedad de isoformas generadas por *splicing* o procesamiento alternativo de los transcritos de FGFR (Eswarakumar et al. 2005; Hu y Bouloux 2010). Las diferentes isoformas de los FGFRs incluyen un dominio extracelular compuesto por tres dominios tipo inmunoglobulina (Ig)-like. El tercer dominio Ig-like (D3) determina la especificidad de unión al ligando y media la dimerización del receptor inducida por dicho ligando, que conlleva la autofosforilación en *trans* del receptor y como consecuencia, su activación (Furdui et al. 2006; Schlessinger y Ullrich 1992). El *splicing* alternativo en D3 existe en FGFR1, 2 y 3, pero no en FGFR4 (Miki et al. 1992; Werner et al. 1992; Yayon et al. 1992). El exón 7 del gen FGFR1 codifica para la primera mitad del dominio D3, designada como 'a'. Los exones 8 y 9, mediante el *splicing* alternativo, codifican alternativamente para la segunda mitad del dominio D3 dando lugar a las isoformas 'b' y 'c' de FGFR1, respectivamente (Eswarakumar et al. 2005). Estudios previos han demostrado que es la isoforma IIIc de FGFR1 la que está implicada en la patogenia del KS (Dodé et al. 2007; Pitteloud et al. 2006) y, de hecho, anosmina-1 se une a FGFR1IIIc con mucha más afinidad que a FGFR2IIIc o FGFR3IIIc (Hu et al. 2009). Además, anosmina-1 induce la proliferación de las células linfoides BaF3 que expresan FGFR1IIIc pero no expresan las isoformas FGFR2IIIc o FGFR3IIIc (González-Martínez et al. 2004; Hu et al. 2009; Ornitz et al. 1996). Estos hallazgos sugieren que la alteración de la señalización a través de la isoforma IIIc del receptor FGFR1 consolida la patogénesis molecular del KS.



**Figura 3: Estructura del receptor FGFR1.** Diagrama esquemático de los dominios de la proteína (SP, péptido señal; Ig I-II-III, dominios inmunoglobulin-like; S-S, puentes disulfuro; TM, dominio transmembrana; TK 1-2, dominios tirosina quinasa). El sitio de unión al ligando FGF se encuentra entre los dominio D2 y D3. La región D1 está implicada en mecanismos de autoinhibición. *Adaptado de Eswarakumar et al. 2005.*

#### 1.4. Sintomatología del Síndrome de Kallmann

El KS es genéticamente heterogéneo con tres modos de herencia: forma ligada al cromosoma X, debida a mutaciones en el gen *KAL1* (Hardelin 2001); la forma dominante autosómica, debida a mutaciones en el gen *KAL2* (Dodé et al. 2003); y la menos frecuente es la forma autosómica recesiva, aunque también hay casos esporádicos, supuestamente debidos a mutaciones *de novo* (Quinton et al. 2001). Las mutaciones en los genes *KAL1* y *KAL2* apenas se dan en el 15% de todos los casos del KS, y aquellas descritas en el gen *KAL1* son, principalmente, deleciones o inserciones que dan lugar a la introducción de un codón de parada prematuro o cambios en el marco de lectura (Albuisson et al. 2005; Dodé et al. 2003; Martin et al. 2011; Pitteloud et al. 2005; Sato et al. 2004).

Aunque menos del 20% de las mutaciones asociadas al KS se producen por un cambio de aminoácido (Bianco y Kaiser 2009; Dodé y Hardelin 2009; Hu y Bouloux 2010; Pitteloud et al. 2006), se han identificado mutaciones puntuales de este tipo en el locus *KAL1* de pacientes con KS. En concreto se han encontrado las mutaciones C163Y y C172R en el dominio WAP de anosmina-1, que podrían afectar a la formación de un puente disulfuro desestabilizando la estructura terciaria de este dominio (Bianco y Kaiser 2009; Oliveira et al. 2001). El resto de mutaciones por cambio de aminoácido se han localizado en los dominios FnIII, como la mutación N267K en el dominio FnIII.1 (Robertson et al. 2001) y las mutaciones E514K y F517L en el dominio FnIII.3 (Georgopoulos et al. 1997; Maya-Núñez et al. 1998) que pueden afectar al plegamiento y la estabilidad estructural de la proteína (Kim et al. 2008).

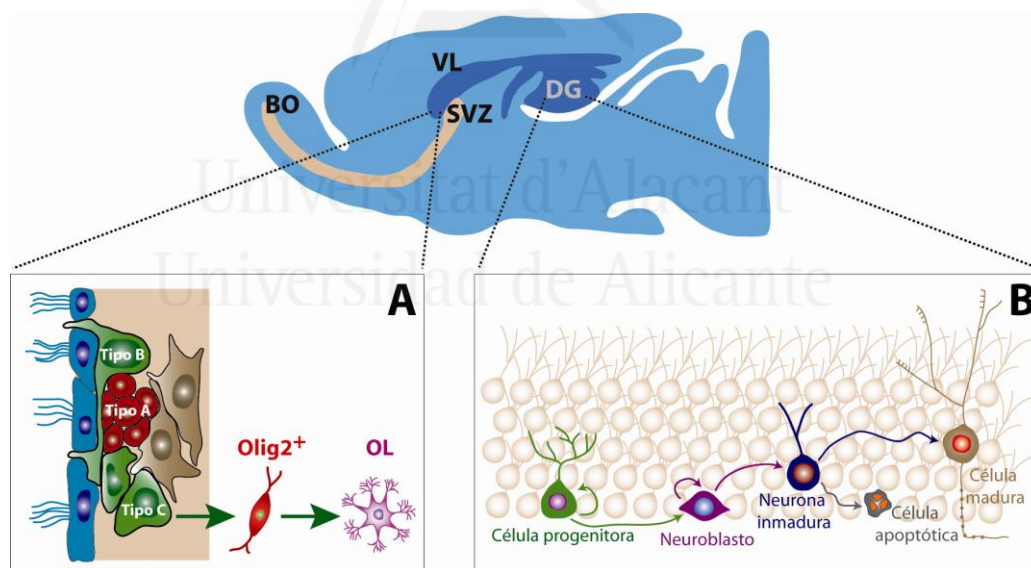
Una variedad de síntomas satélites han sido descritos en algunos pacientes con KS. Algunos de ellos podrían estar asociados a deficiencias en la migración de los OPCs y/o la mielinización de los axones de diferentes tractos, como las sinquinesias (Conrad et al. 1978) y los movimientos anómalos de los ojos (Schwankhaus et al. 1989). Ambos síntomas pueden ser el resultado de alteraciones como la pérdida o la desorganización axonal del cuerpo calloso y/o del tracto corticoespinal (Gallea et al. 2011; Köenigkam-Santos et al. 2008; Köenigkam-Santos et al. 2010), dos de las regiones que presentan una alta densidad de oligodendrocitos (OLs) anosmina-1<sup>+</sup> (Clemente et al. 2008). Otros síntomas satélites descritos en pacientes afectados con KS son la agenesia renal (Kirk et al. 1994) y el deterioro auditivo (Hill et al. 1992; Lieblich et al. 1982; Tsai y Gill 2006), entre otras anomalías.

## 2. DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL

La corteza cerebral es una de las estructuras más complejas en el SNC. Surge de la evaginación de las vesículas telencefálicas, que se desarrollan histogenéticamente de modo diferente en sus porciones cortical (palial) y nuclear (subpalial). El palio crece mucho en superficie y escasamente en grosor, dando lugar a la corteza cerebral. El subpalio, en cambio, crece mucho más en grosor que en superficie, dando lugar a la eminencia glanglionare medial (MGE) y lateral (LGE) (Puelles, 2008).

La zona germinal de la corteza cerebral es la zona ventricular, un neuroepitelio que se extiende a lo largo de los ventrículos laterales. Las células progenitoras de esta zona (tipo B) dan lugar a las células amplificadoras (tipo C) capaces de generar neuronas, astrocitos y OLs (Lieblich et al. 1982).

La neurogénesis cortical es, principalmente, un proceso prenatal, y es sustituida en el periodo postnatal por la generación de células gliales, que se originan en la SVZ, una segunda capa de células germinales que persiste en el adulto (Altman 1969; Lois y Álvarez-Buylla 1993; Luskin 1993). La generación de neuronas se ha completado esencialmente en el momento del nacimiento y una neurogénesis limitada persiste en la SVZ y en el hipocampo (Álvarez-Buylla et al. 2000; García-Verdugo et al. 1998; Ma et al. 2009).

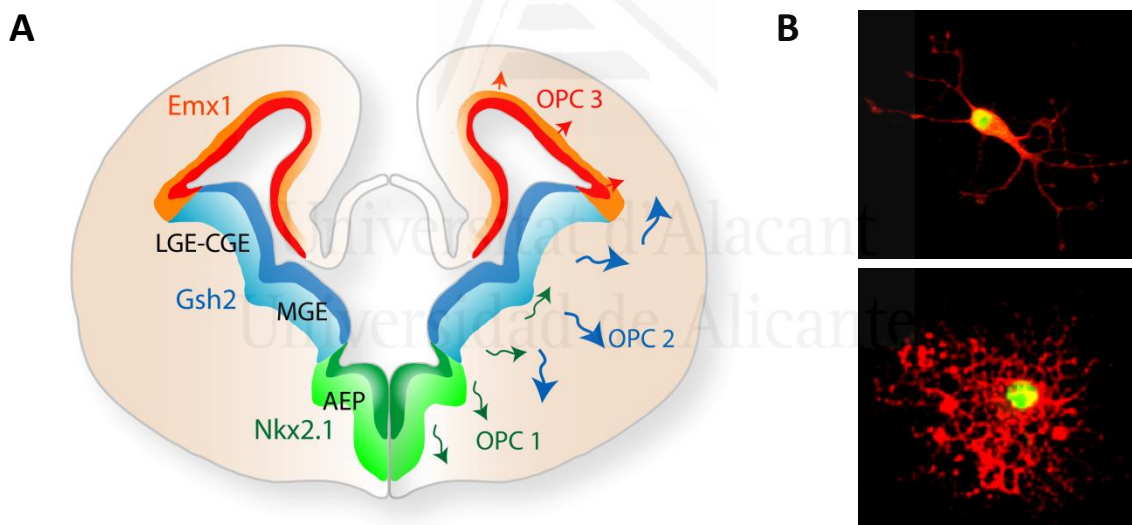


**Figura 4: Nichos neurogénicos durante el desarrollo y en el estado adulto.** Vista sagital del cerebro de ratón mostrando la SVZ y el giro dentado (DG). En la SVZ, las células progenitoras (tipo B) van a dar lugar a las células amplificadoras (tipo C). Las células tipo C son las precursoras tanto de las células que darán lugar a los OLs, como de una población de neuronas inmaduras (tipo A o neuroblastos) que migran hacia el BO por la corriente migratoria rostral (A). En el DG del hipocampo, las células progenitoras de la zona subgranular proliferan y pasan por diferentes cambios morfológicos y fisiológicos hasta que se diferencian y se integran como células maduras (B). *Adaptado de González-Pérez et al. 2009 y Ma et al. 2009.*

## 2.1. Oligodendroglíogenesis

Los OLs se originan a lo largo del tubo neural a partir de los progenitores de oligodendrocitos, que posteriormente van a dar lugar a los precursores de oligodendrocitos (OPCs) (Miller 2002; Qi et al. 2002; Yu et al. 1994).

La oligodendroglíogenesis en el prosencéfalo es un proceso complejo y dinámico. En el ratón, a E12.5, existe una primera oleada de OPCs que se generan a partir de las células precursoras que expresan *Nkx2.1* en el área entopeduncular anterior (AEP) y en la zona ventricular de la MGE. A medida que el desarrollo continúa, los OPCs y OLs que derivan de las células *Nkx2.1* positivas disminuyen en la corteza cerebral diez días tras el nacimiento, aunque todavía son la población mayoritaria en la región ventral. Estas células serán reemplazadas por otra población de OPCs que derivan de células precursoras *Gsh2* positivas en la eminencia ganglionar lateral y caudal (LGE y CGE, respectivamente), y posteriormente, por precursores corticales positivos a *Emx1* que mielinizarán el neocórtex. De este modo, tres oleadas de subpoblaciones de OPCs compiten por el espacio y son necesarias para colonizar el SNC durante el desarrollo, siguiendo una progresión temporal ventro-dorsal (Kessaris et al. 2006).



**Figura 5: Oligodendroglíogenesis durante el desarrollo en el ratón.** Tres oleadas secuenciales de OPCs (OPC 1, OPC 2 y OPC 3) se producen desde diferentes regiones de la zona ventricular del prosencéfalo. La primera oleada (OPC 1, en verde) se origina en la AEP y MGE, aproximadamente a partir del estado embrionario E12.5; la segunda oleada (OPC 2, en azul) se produce a partir de E15.5 desde la LGE y la CGE; y la tercera oleada (OPC 3, en rojo) empieza desde el nacimiento donde los OPCs se originan en el córtex. Los OPC 1 son sustituidos por las sucesivas oleadas (Kessaris et al. 2006). *Imagen adaptada de Rowith y Kriegstein, 2010 (A).* Fotografía de un OPC A2B5<sup>+</sup>/Olig2<sup>+</sup> (derecha arriba) y un OL MBP<sup>+</sup>/Olig2<sup>+</sup> (derecha abajo) (B).

Dependiendo de su sitio de proliferación, los OPCs adoptan un patrón de migración recorriendo largas distancias para colonizar diferentes zonas del cerebro de manera específica antes de diferenciarse en OLs maduros capaces de mielinizar los axones (de Castro y Bribián 2005; Jarjour y Kennedy 2004; Miller 2002; Olivier et al. 2001;



Rowitch y Kriegstein 2010). Un buen ejemplo es el de los OPCs que se generan en el área preóptica del ratón, los cuales se originan en la línea media ventral del tercer ventrículo y migran durante el desarrollo desde el quiasma óptico hasta el nervio óptico (Miller 1996). La existencia de diferentes patrones de migración entre las zonas ventral y caudal del cerebro sugiere que las propiedades del entorno en el que se originan los OPCs son esenciales para controlar la migración de estas células durante el desarrollo del SNC.

## 2.2. Migración y diferenciación de los OPCs

Los OPCs necesitan señales que promuevan su migración desde el lugar donde se generan hasta su destino final, donde contactan con los axones que van a mielinizar. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico 2 (*fibroblastic growth factor*, FGF2) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF) han sido implicados en la migración de los OPCs. Tanto PDGF como FGF2 promueven juntos la migración de los OPCs (Armstrong et al. 1990; Milner et al. 1996; Simpson y Armstrong 1999; Vora et al. 2011), además de promover la proliferación y diferenciación de estas células (Bansal et al. 2003; Baron et al. 2000; Gibney y McDermott 2007; Hu et al. 2008; Lachapelle et al. 2002). Puesto que los OPCs expresan tanto receptores para PDGF como para FGF durante las últimas fases de diferenciación oligodendroglial (Redwine et al. 1997), se ha propuesto que la capacidad migratoria de estas células es adquirida mediante un mecanismo de señalización intracelular a través de FGF y de PDGF, actuando ambos factores por vías diferentes (Simpson y Armstrong 1999).

Las células de la línea oligodendroglial expresan los receptores FGFR1, FGFR2 y FGFR3, pero solo FGFR1 media la migración de los OPCs a través de FGF2, mientras que FGFR2 y FGFR3 promueven la proliferación y diferenciación de estas células (Bansal et al. 1996). La señalización de FGF, a través de los receptores FGFR1 y FGFR2, pero no FGFR3, es necesaria para la generación inicial de los OPCs en el prosencéfalo ventral en ratón, siendo FGFR1 el inductor más importante (Bansal y Pfeiffer 1997; Furusho et al. 2011). La variabilidad y disponibilidad de ligando junto con cambios en la expresión de los FGFRs dan lugar a un repertorio de diferentes cascadas de señalización que regulan el desarrollo normal de los OLs. De esta manera, la estimulación de los OLs maduros y el crecimiento de la vaina de mielina está controlado por la señalización a través de FGFRs mediante la regulación de la actividad de ERK1/2 *in vitro* (Fortin et al. 2005). Estudios *in vivo* muestran una disminución de pERK1/2 en ratones mutantes para *fgfr1<sup>-/-</sup>;fgfr2<sup>-/-</sup>* que resulta en la hipomielinización del SNC (Furusho et al. 2012). En ratones carentes tanto de ERK1 como ERK2, pese a que sus OPCs proliferan y se diferencian adecuadamente, no se produce correctamente la activación de la transcripción de los genes que regulan la síntesis de las proteínas que conforman la mielina. De esta manera, los OLs no son capaces de aumentar el grosor de la mielina paralelamente al incremento del diámetro del axón, debido a una disminución en el número de envueltas de mielina (Ishii et al. 2012). Por el contrario, la activación de ERK1/2 en los OLs promueve el proceso de mielinización *in vitro*, no sólo

adelantando la mielinización sino induciendo un aumento en el número de OLs maduros capaces de mielinizar (Xiao et al. 2012).

La principal prueba sobre la relevancia del factor PDGF $\alpha$  en la migración de los OPCs se basa en el estudio de una línea de ratón knockout para esta molécula. Estos animales muestran una disminución en el número de OPCs PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> presentes en el nacimiento, seguido de una reducción en el número de OLs y una hipomielinización postnatal (Fruttiger et al. 1999).

El factor de crecimiento endotelial (VEGF) promueve la migración de los OPCs, debido a una reorganización de la actina en su citoesqueleto por la activación de la cascada de señalización dependiente de ROS y FAK, sin afectar a su proliferación (Hayakawa et al. 2011; Hayakawa et al. 2012). En el adulto, la infusión intraventricular del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF) promueve la proliferación y la migración de progenitores neurales desde la superficie ventricular (Fricker-Gates et al. 2000), mientras que sobre la oligodendrogía, el EGF favorece su proliferación, migración y diferenciación (González-Pérez et al. 2009). El aumento de la señalización a través de EGFR incrementa la mielinización durante el desarrollo, así como la oligodendrogénesis y la remielinización después de una desmielinización puntual en el cuerpo calloso (Aguirre y Gallo 2007; Aguirre et al. 2007).

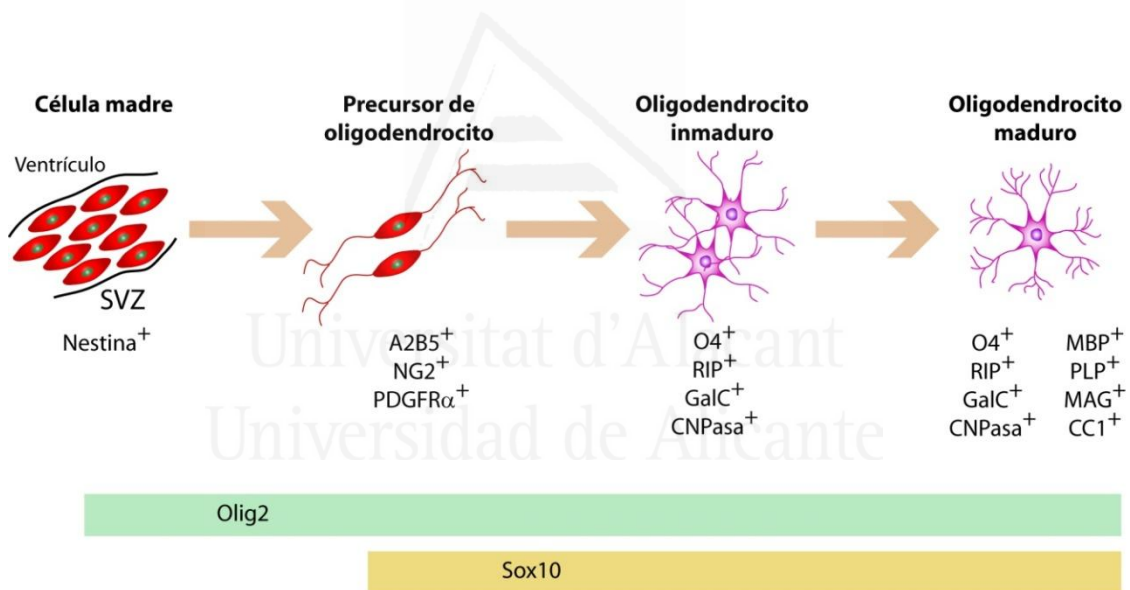
Otro factor de crecimiento, la neuroregulina 1, es un potente quimioatrayente *in vitro* para los OPCs en el nervio óptico embrionario, vía el receptor ErbB4. De hecho, los ratones knockout para ErbB4 muestran una disminución en la migración de los OPC *in vivo* (Ortega et al. 2012). Las neuroregulinas, como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF), han sido identificados como reguladores de la diferenciación de los OLs por la activación de sus correspondientes receptores expresados en la superficie de estas células (Brinkmann et al. 2008; Carson et al. 1993; Stankoff et al. 2002). La endotelina-1 (ET-1) promueve la migración de los OPCs, a través de la fosforilación de CREB y ERK, inducida por la activación de los receptores de ET-1 (Gadea et al. 2008). Además, la estimulación de los OPCs con ET-1 induce la expresión de proteínas de mielina como MBP (Jung et al. 2011).

Durante su migración, los OPCs son guiados por moléculas de adhesión de la ECM. Sustratos como laminina, fibronectina, vitronectina o anosmina-1 promueven la adhesión de los OPCs, y directa o indirectamente la migración, mientras que el colágeno la inhibe (Bribián et al. 2008; Milner et al. 1996). Las moléculas fibronectina y merosina promueven la migración (solo o en combinación con PDGF), sin embargo, tenascina-C selectivamente inhibe la migración de los OPCs que responden a fibronectina pero no a merosina (Frost et al. 1996). Tenascina-C actúa, no sólo de manera dependiente de adhesión, sino también a través de mecanismos independientes de adhesión para inhibir la migración de los OPCs (Kiernan et al. 1996).

Un grupo de moléculas secretadas que promueven la migración de los OPCs son las moléculas como PSA-NCAM, netrinas y semaforinas. PSA-NCAM está implicada en la dirección de migración de los OPCs en respuesta a un gradiente de PDGF $\alpha$  (Zhang et al.

2004). Netrina-1 ejerce un efecto quimiorrepulsivo en la dispersión inicial de los OPCs de la médula espinal (Tsai et al. 2003). Netrina-1 y sema3F poseen un efecto quimioatractivo y sema3A presenta un efecto quimiorrepelente sobre los OPCs del quiasma óptico e inhibe su migración hacia la retina durante el desarrollo (Spassky et al. 2002; Sugimoto et al. 2001).

Cada paso en la maduración de los OLs, desde el estado de precursor hasta el de OL maduro mielinizante, puede ser identificado por cambios en la morfología celular y en la expresión de marcadores específicos (Rowitch 2004). Este proceso, que se inicia durante la embriogénesis y continúa en el estado adulto, está regulado por señales extracelulares y una red de factores intracelulares coordinados en el espacio y en el tiempo. Factores específicos que promueven la diferenciación de los OLs son, por ejemplo, Olig1/2, Sox10, YY1, Nkx2.2, Zfp488, MRF y Zfp191 (Emery et al. 2009; He et al. 2007; Howng et al. 2010; Li et al. 2007; Wang et al. 2006; Xin et al. 2005), y coordinan las señales inhibitorias tales como BMP, Wnt y Notch (Emery 2010; Grinspan et al. 2000; Mekki-Dauriac et al. 2002; See et al. 2004). El equilibrio resultante entre las señales reguladoras positivas y negativas controla el proceso de mielinización.



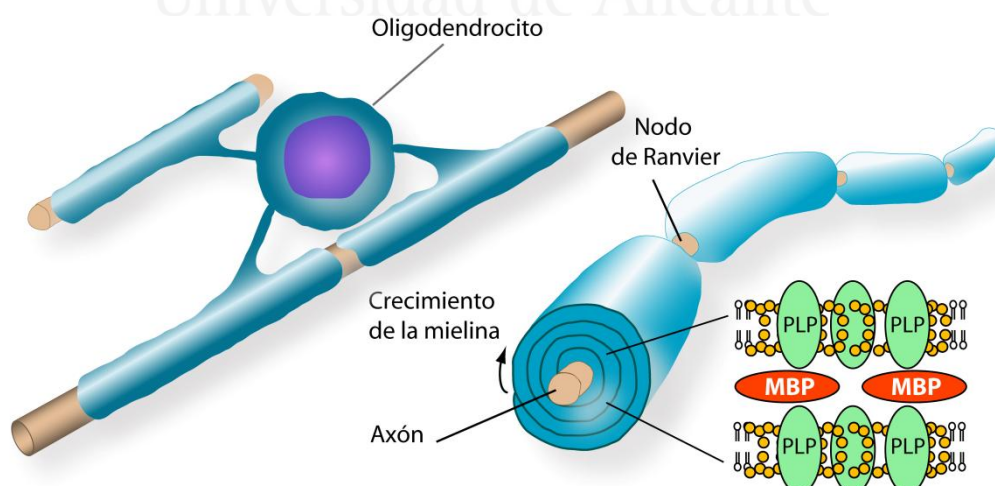
**Figura 6: Principales etapas del desarrollo de los OLs.** Los OPCs se originan a partir de células madre en la SVZ y colonizan el SNC. Estas células poseen una morfología bipolar, tienen capacidad de proliferar, y sobre todo, de migrar. En comparación con los OPCs, los OLs diferenciados, ya sean inmaduros o maduros, tienen una morfología más compleja y ya no migran. Dependiendo del estado de diferenciación, los células del linaje oligodendroglial expresan antígenos que permiten distinguirlos con diferentes marcadores (Bansal y Pfeiffer 1992).



### 2.3. Mielinización del SNC

En el adulto, los OLs se distribuyen homogéneamente por todo el SNC, incluyendo tanto la materia blanca como la materia gris (Mallon et al. 2002; Miller 1996). La característica más importante de estas células es su capacidad para formar la vaina de mielina que recubre los axones, proporcionando un aislamiento que facilita la conducción saltatoria del impulso eléctrico de una manera rápida a lo largo de las fibras nerviosas del SNC (Barres y Barde 2000).

Aunque la vaina de mielina está mayoritariamente compuesta por lípidos, estas extensiones especializadas de la membrana de los OLs y de las células de Schwann también contienen proteínas que proporcionan integridad, estructura y funcionalidad a la vaina de mielina (Lee y Fields 2009). En el SNC, las proteínas de mielina más importantes incluyen la proteína proteolípídica ("*proteolipid protein*", PLP) y un péptido relacionado con la misma DM20; la proteína básica de mielina ("*myelin basic protein*", MBP), la glicoproteína asociada a mielina ("*myelin-associated glycoprotein*", MAG) y la 2',3'-nucleótido-cíclico 3'-phosphodiesterasa ("*2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*", CNPasa) (Jahn et al. 2009). PLP y MBP, son las proteínas más abundantes en la vaina de mielina, constituyendo un 80% del total del contenido proteico, y están implicadas en el proceso de compactación que genera la estructura multicapa de la mielina madura (Fulton et al. 2010; Baron y Hoekstra 2010). Al contrario que las células de Schwann, un OL puede mielinizar varios axones, pero no todos son mielinizados de manera simultánea, por lo que la producción de mielina es un proceso altamente regulado (Baron y Hoekstra 2010). Diversas señales provenientes de neuronas eléctricamente activas, tales como factores de crecimiento, factores neurotróficos y la propia actividad eléctrica, regulan los acontecimientos celulares implicados en la mielinización y en la expresión de genes en los OLs (Demerens et al. 1996; Ishibashi et al. 2006).



**Figura 7: Mielinización de los axones y disposición de la mielina.** En el SNC, la mielina está formada por los OLs que se enrollan alrededor de los axones de varias neuronas proporcionando soporte estructural a las mismas y aislando sus axones. Las interrupciones que se suceden a intervalos regulares a lo largo de la longitud del axón en la vaina de mielina se denominan nodos de Ranvier. La disposición de las dos proteínas mayoritarias en la mielina (PLP y MBP) se muestra en la mielina compacta localizada en el internodo. *Adaptado de Lee y Fields 2009; Jahn et al. 2009.*

Para asegurar una rápida y eficiente conducción del impulso nervioso, los axones mielinizados establecen y mantienen porciones no mielinizadas denominadas nodos de Ranvier. En ellos se concentran los canales de sodio, los cuales median la despolarización de la membrana dando lugar a la conducción saltatoria. En los paranodos, la región que flanquea cada lado del nodo, se agrupan las proteínas paranodina, neurexina y caspr, que anclan la vaina de mielina al axón y forman una barrera física entre los canales de sodio del nodo de Ranvier y los canales de potasio de la región yuxtaparanodal (Dupree et al. 2004). La estrecha asociación entre los paranodos y las membranas de las células gliales actúa de barrera entre el nodo y la región yuxtaparanodal, aislando la actividad eléctrica del nodo de Ranvier y evitando la difusión lateral de las proteínas (Poliak y Peles 2003).

Alteraciones en el proceso molecular que conlleva la mielinización del axón dan lugar a una conducción eléctrica anormal, dificultando la transferencia de información entre las diferentes regiones del cerebro. La comunicación entre axones y OLs es de vital importancia en aquellas enfermedades neurológicas en que la pérdida de los OLs y la desmielinización está asociada con una degeneración de los axones. Por ejemplo, en la esclerosis múltiple (EM), la pérdida de OLs y la desmielinización están asociadas a una degeneración progresiva de los axones y un declive neurológico (Arnold 1999; Trapp et al. 1999).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

***HIPÓTESIS***



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Para este trabajo, encaminado a la obtención del título de doctor, hemos partido de dos hipótesis interrelacionadas:

1. *Análisis de la interacción entre anosmina-1, FGFR1 y componentes de la matriz extracelular.*

La existencia de una interacción física y funcional entre anosmina-1 y FGFR1 ha sido demostrada anteriormente (Ayari y Soussi-Yanicostas 2007; Bribián et al. 2006; Dodé et al. 2003; González-Martínez et al. 2004; Hu et al. 2009). Además, se han descrito interacciones homofílicas anosmina-1/anosmina-1 y heterofílicas de anosmina-1 con otros componentes de la matriz extracelular (Bribián et al. 2008). Sin embargo, los dominios específicos de anosmina-1 implicados en todas estas interacciones no se conocen.

Anosmina-1 posee una estructura modular compuesta por una región N-terminal rica en residuos de cisteína, un dominio WAP, cuatro dominios FnIII y una región C-terminal rica en histidinas y residuos básicos. Proteínas de la matriz extracelular que contienen dominios FnIII, como las proteínas L1, NCAM y FLRT3, son capaces de unirse al receptor FGFR1 a través dichos dominios (Bottcher et al. 2004; Kiselyov et al. 2003; Kulahin et al. 2008). Nuestra hipótesis se basa en que, al igual que estas moléculas, anosmina-1 podría interactuar con el receptor FGFR1 y con otras proteínas de la matriz extracelular (laminina, fibronectina, anosmina-1), bien a través de sus dominios FnIII, o quizá a través de otros de sus dominios.

Algunas de las mutaciones puntuales de cambio de aminoácido, identificadas en el locus *KAL1* de pacientes afectados con síndrome de Kallmann, impiden la unión a FGFR1 (Hu et al 2009) y suprimen la migración de una línea celular inmortalizada (GN11) derivada de neuronas GnRH promovida por anosmina-1 (Cariboni et al. 2004). Nuestro grupo ha descrito que anosmina-1, vía FGFR1, es quimioatrayente para los neuroblastos de la zona subventricular del cerebro anterior (García-González et al., 2010). Tomando como referencia este modelo para nuestros estudios, pensamos que la introducción en anosmina-1 de alguna de las mutaciones descritas, podría afectar tanto a la unión con FGFR1 como al efecto biológico de la proteína sobre los neuroblastos a través de este receptor.

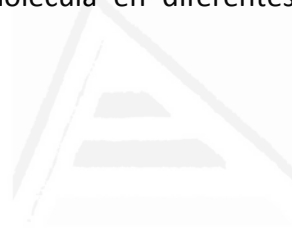
2. *Caracterización de una línea de ratón transgénico que sobreexpresa la proteína anosmina-1.*

Anosmina-1 participa en diversas funciones en el SNC, entre ellas, presenta un efecto quimiotáctico para las neuronas GnRH (Cariboni et al 2004) y participa en la migración y adhesión de precursores de oligodendrocitos (Bribián et al 2006; Bribián et al 2008). Además, es quimioatrayente para los axones de las neuronas de proyección del bulbo

olfativo y para los neuroblastos que migran de la zona subventricular, e indispensable para la formación de las colaterales axónicas del bulbo olfativo y de las neuronas de proyección del cerebelo (Soussi-Yanicostas et al 2002; Gianola et al 2008; García-González et al 2010).

Esta variabilidad funcional también ha sido observada en otros organismos como *Drosophila*, donde la sobreexpresión de anosmina-1 produce un defecto estructural durante el desarrollo (Andrenacci et al 2006). En *C. elegans*, la sobreexpresión de esta proteína en las interneuronas AIY produce un defecto en la ramificación de los axones (Bülow et al 2002) y en el crecimiento de neuritas (Rugarli et al 2002). En *Danio rerio* (pez cebra) la inactivación del ortólogo de *KAL1*, llamado *kal1a*, afecta al desarrollo del bulbo olfativo, así como a la diferenciación de las neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas de esta estructura (Yanicostas et al 2009).

Debido a que no se ha descrito un ortólogo del gen *KAL1* ni en rata ni en ratón que permita anular su expresión y analizar las posibles consecuencias derivadas de dicha inactivación, pensamos que la generación de una línea de ratón transgénico que sobreexpresa la proteína anosmina-1 humana puede ser una buena herramienta para estudiar la función de esta molécula en diferentes poblaciones celulares durante el desarrollo del SNC.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **OBJETIVOS**





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Objetivo principal:**

- Dilucidar la función y los mecanismos moleculares de actuación de la proteína anosmina-1.

**Objetivos específicos:**

1. Identificar las regiones de anosmina-1 que participan en su interacción con el receptor FGFR1 y determinar qué mutaciones descritas en el gen *KAL1* de pacientes con síndrome de Kallmann, en aquellos dominios implicados en la interacción, pueden afectar a la unión de esta proteína con el receptor FGFR1.
2. Estudiar el papel de los dominios de anosmina-1, implicados o no en la unión con FGFR1, en la migración de los neuroblastos a través de dicho receptor, así como el papel de las mutaciones descritas en estos dominios en pacientes con KS.
3. Analizar la interacción de anosmina-1 con diferentes moléculas de la matriz extracelular, como laminina, fibronectina y las interacciones homofílicas anosmina-1/anosmina-1, así como identificar las regiones de anosmina-1 que participan en dichas interacciones.
4. Caracterizar una línea transgénica de ratón que sobreexpresa la proteína anosmina-1 y estudiar el efecto de la sobreexpresión de esta proteína en el desarrollo del SNC, concretamente, en los precursores de oligodendrocitos *in vivo* e *in vitro*.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

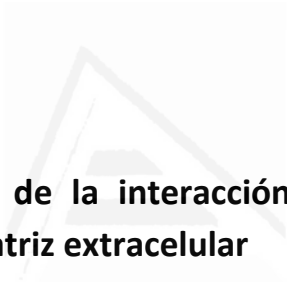


Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **RESULTADOS**



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



**CAPÍTULO 1. Análisis de la interacción anosmina-1/FGFR1 y otros componentes de la matriz extracelular**

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Biochemical dissection of Anosmin-1 interaction with FGFR1 and components of the extracellular matrix.**

Verónica Murcia-Belmonte\*, Pedro F. Esteban\*, Diego García-González and Fernando de Castro

Grupo de Neurobiología del Desarrollo-GNDe, Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo, Spain.

*Journal of Neurochemistry* (2010) **115**, 1256-1265.

\*These authors contributed equally to this work.





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**The cysteine-rich region and the whey acidic protein domain are essential for anosmin-1 biological functions.**

Pedro F. Esteban\*, Verónica Murcia-Belmonte\*, Diego García-González and Fernando de Castro

Grupo de Neurobiología del Desarrollo-GNDe, Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo, Spain.

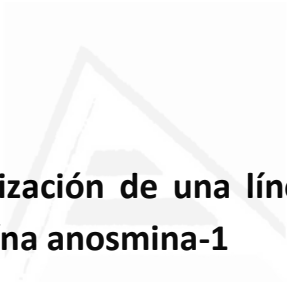
*Journal of Neurochemistry* (2013)

doi: 10.1111/jnc.12104.

\*These authors contributed equally to this work.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



**CAPÍTULO 2. Caracterización de una línea de ratón transgénico que sobreexpresa la proteína anosmina-1**

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 2.1. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1.1. GENERACIÓN DE UNA LÍNEA DE RATÓN TRANSGÉNICO QUE SOBREEXPRESA ANOSMINA-1

El ADNc del gen *KAL1* humano fue utilizado para generar la línea de ratón transgénico que sobreexpresa la proteína anosmina-1 (A1) bajo el control del promotor de la  $\beta$ -actina humana en el vector pBAP (Gunning et al. 1987) cedido por el Dr. Lino Tessarollo (NCI, Frederick, MD 21702, USA), seguido por una secuencia IRES y el ADNc para el gen *EGFP* como reportero. El gen *EGFP* facilitó la detección de la expresión de esta proteína en los ratones mediante *Western blot*. La inyección del ADN así como la generación de los animales fundadores fue llevada a cabo en la Unidad de Generación de Organismos Modificados Genéticamente del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

El genotipado mediante PCR fue realizado sobre el ADN genómico extraído de la cola de los ratones utilizando los siguientes cebadores:

*hKalexon11*: 5'-GGTGACTGTCCAACCAATACG-3'  
*hKalexon12*: 5'-GGAAGGCAGAATCTGGGACTG-3';  
*EGFP15*: 5'-GCGACGTAAACGGCCACAAG-3';  
*EGFP23*: 5'-CGGTCACGAACTCCAGCAGG-3'

Los animales proceden del animalario del Hospital Nacional de Parapléjicos y de las empresas *Charles River Laboratories* y *Janvier*, cuando fueron necesarios ratones C57BL/6. En estas instalaciones los animales se mantuvieron en condiciones controladas (temperatura  $22\pm 2^\circ\text{C}$  y humedad  $50\pm 10\%$ ), en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y alimentados *ad libitum* con agua y pienso esterilizado por irradiación.

Todos los experimentos realizados en este estudio en los que se usan animales fueron realizados de acuerdo con la legislación española (RD223/88) y europea vigentes (86/609/ECC), y fueron sometidos a la evaluación del comité de bienestar animal del Hospital Nacional de Parapléjicos (SAPA001) y aprobados por la Comisión de Cuidado Animal de este Hospital.

## **2.1.2. HISTOLOGÍA**

### **Preparación del tejido**

Los animales control (+/+) y los transgénicos que sobreexpresan A1 fueron perfundidos intracardiácamamente a las edad embrionaria E16.5 y a edades postnatales P0, P5, P15 y P30 con tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4), seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4. Se postfijaron en el mismo fijador durante 4 horas y se lavaron tres veces con PB antes de ser crioprotegidos por inmersión en sacarosa al 30% (peso/volumen) en PB. El tejido fue incluido en bloques de gelatina, congelado por inmersión en isopentano a -60°C y almacenado a -80°C. Las secciones coronales, de 20 µm de grosor, fueron obtenidas con un criostato (Leica) y almacenadas a -20°C hasta su uso.

### **Inmunohistoquímica**

Las secciones, tras varios lavados en PB, se pretrataron para inactivar las peroxidasas endógenas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) y metanol (10%) en PB durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron en PB y fueron bloqueadas con suero de burro o de cabra (Vector Laboratories) al 5% en PB y permeabilizados con Triton X-100 al 0,2% durante 1 hora a temperatura ambiente. El marcaje se llevó a cabo incubando el tejido durante una noche a 4°C en la misma solución de bloqueo junto con los anticuerpos primarios utilizados en cada caso: anti-Olig2 (1:500; AB9610 Millipore o 1:200; AF2418 RD), anti-Histone H3 (phospho S-10) (1:200; ab5176 Abcam), anti-PDGFR $\alpha$  (1:100; sc-338 Santa Cruz), anti- $\alpha$ CC1 (1:200; Calbiochem), y anti-Caspr (1:300, ab34151 Abcam). El anticuerpo primario fue detectado con el respectivo anticuerpo secundario biotinilado IgG (1:200; Vector Laboratories) en la misma solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente, y con el kit Vectastain Elite ABC (1:200 en PBS con Triton X-100 al 0,2%; Vector Laboratories). La reacción fue revelada con 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) al 0,0125% como cromógeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,003% en tampón Tris-HCl 0,1 M con pH 7,6. El tejido de la misma edad para los dos genotipos estudiados fue revelado con DAB en la misma cubeta de tinción y el mismo tiempo de reacción fue aplicado para todas las muestras en cada cubeta. Por último, las secciones fueron deshidratadas en una serie de alcoholes de gradación ascendente (50, 70, 80, 95, absoluto), limpiadas con xilol y montadas con medio de montaje Entellan (Merk) y un cubreobjetos.

### **Inmunofluorescencia**

El procedimiento fue el mismo hasta la incubación con el anticuerpo secundario pero omitiendo la inactivación de las peroxidasas endógenas. Los anticuerpos

secundarios utilizados fueron Alexa 488, Alexa 594, Alexa 647 (1:1000, Invitrogen), o TexasRed (1:200, The Jackson Laboratories) a temperatura ambiente durante una hora. Tras varios lavados en PBS, el tejido fue marcado con la solución de Hoechst 33342 para visualizar el núcleo (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sigma-Aldrich). Las secciones fluorescentes fueron montadas con Fluoromount G (SouthernBiotech) y un cubreobjetos. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio confocal de escáner resonante TCS SP5 o con un microscopio confocal TCS SP5 (Leica), según cada caso.

### Recuentos celulares

La densidad de células  $\text{Olig2}^+$ ,  $\text{Olig2}^+/\text{pH3}$ ,  $\text{Olig2}^+/\text{PDGFR}\alpha$  y  $\text{Olig2}^+/\alpha\text{CC1}$  fue determinada examinando las secciones coronales y cuantificando el número de células positivas para estos marcadores dentro de regiones comparables de la SVZ y del cuerpo calloso (Pringle et al. 1992; Maire et al. 2010). Dependiendo de la edad analizada, desde la región rostral a la caudal, 3 secciones de cada región fueron analizadas para un mínimo de 3 animales por edad y genotipo. Para cada fotografía, entre 10 y 16 regiones de interés (ROI) fueron seleccionadas al azar y todas las células de cada ROI fueron contadas. La longitud de los nodos de Ranvier fue analizada en microfotografías tomadas con un microscopio confocal TCS SP5 (Leica) de la misma región del cuerpo calloso en tres animales P60 por genotipo. Para calcular la densidad de nodos de Ranvier como una medida indirecta de la longitud internodal (para información más detallada ver Savvaki et al. 2008), se utilizó un área de  $64 \times 64 \mu\text{m}$  para contar todos los nodos marcados con el anticuerpo anti-Caspr, que marca la región paranodal en los axones. Tres imágenes por animal, tomadas con un microscopio confocal escáner resonante TCS SP5, y tres animales por genotipo se utilizaron para el análisis con el software ImageJ.

#### 2.1.3. CULTIVO CELULAR

Los OPCs fueron obtenidos de cortezas cerebrales de animales postnatales P0 tanto controles C57BL/6 (+/+) como transgénicos (A1), siguiendo el protocolo adaptado para la purificación de OPCs mediante agitación (McCarthy and de Vellis 1980; Molina-Holgado et al. 2002).

#### Ensayos de quimiotaxis

Los estudios de migración de OPCs fueron llevados a cabo en cámaras de quimiotaxis, también llamadas *transwells*, que tienen una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de  $8 \mu\text{m}$  (Corning Costar). Esta membrana fue tratada con poli-L-lisina y laminina, como está descrito previamente (Merchán et al. 2007). Los OPCs purificados de animales +/+ y animales transgénicos A1 fueron sembrados (40.000 células por *transwell*) en la parte superior de la cámara en medio *Bottenstein-Sato* (BS)



suplementado con suero bovino fetal (SFB) al 1% (Spassky et al. 2002) y el mismo medio fue utilizado en el compartimento inferior. Los OPCs de los animales A1 fueron tratados con el bloqueante SU5402 (10  $\mu$ M; Calbiochem) para los receptores FGFR diluido en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) donde se indica, mientras que el resto de los cultivos fueron expuestos al mismo volumen de DMSO durante el tiempo que duró el experimento, el cual fue llevado a cabo a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad relativa. Tras 20 horas, las células fueron fijadas con PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y lavadas 2 veces con PBS. Las células que no migraron a la superficie de arriba de la membrana fueron eliminadas con un bastoncillo de algodón. La presencia de OPCs transmigrados en la superficie inferior de la membrana fue evaluada mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos anti-A2B5 (1:10, ATCC; CRL-1520, Hybridoma Bank) y anti-Olig2 (1:200, AB9610 Millipore) (Bribián et al. 2006; Merchán et al. 2007; Bribián et al. 2008; Clemente et al. 2011) y sus correspondientes anticuerpos secundarios fluorescentes. El número total de células fue observado mediante el marcaje con Hoechst 33342 (10  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich).

### **Ensayos de diferenciación *in vitro***

Los OPCs fueron obtenidos como se describe arriba y los estudios de diferenciación se realizaron en placas de cultivo de 96 pocillos donde se sembraron 40.000 células en cada uno. Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C en el incubador con una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Tras 2 o 5 días *in vitro* (DIV) en medio de diferenciación (Molina-Holgado et al. 2002), las células fueron fijadas con PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. El *In-Cell Western* se llevó a cabo con un escáner *Odyssey Infrared Imaged System* (LI-COR), marcando los OPCs con anti- $\alpha$ -tubulina (1:80,000, T5168 Sigma-Aldrich) y anti-MBP (1:200, ab7349 Abcam) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos secundarios conjugados con 680 o 800 IRDye nos permitieron escanear las placas P96 en el *Odyssey Infrared Imaging System* y la expresión de las proteínas MBP y  $\alpha$ -tubulina fue analizada siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se representan como el valor de la cantidad relativa de MBP con respecto a la cantidad total de  $\alpha$ -tubulina, normalizada contra el valor para MBP/ $\alpha$ -tubulina de los OPCs control.

Además, los OPCs fueron cultivados en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina y laminina, donde tras 2 o 5 DIV fueron fijados y se realizó una inmunocitoquímica con los anticuerpos anti-Olig2 (1:200, AB9610 Millipore) y anti-MBP (1:200, ab7349 Abcam) para evaluar su estado de diferenciación. Los anticuerpos secundarios fluorescentes usados fueron Alexa 488 y Alexa 594 (1:1000, Invitrogen) y las células fueron marcadas con Hoechst 33342 para visualizar el núcleo (10  $\mu$ g/mL). Los cubreobjetos fueron observados con un microscopio de epifluorescencia (Leica) y se tomaron 10 fotografías por cubreobjetos al azar donde se contaron todas las células.

#### 2.1.4. ANÁLISIS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

Para la purificación del ARN a partir de tejido cerebral, los animales fueron anestesiados y decapitados. Los cerebros fueron inmediatamente congelados en hielo seco y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de ser procesados con Trizol<sup>®</sup> (Ambion) y retrotranscritos a ADNc utilizando el kit de retrotranscripción *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems), como ya se ha descrito previamente (García-González et al. 2010; Ortega et al. 2012). La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para los ARNm de *KAL1* y *Mbp* se llevó a cabo utilizando las correspondientes sondas Taqman y oligonucleótidos (*KAL1*, Hs00608006\_m1\*; *Mbp*, Mm01262037\_m1\* y *Gapdh* como control endógeno, Mm99999915\_g1\*). Las reacciones se desarrollaron en placas P96, en el equipo ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). La expresión relativa del ARNm para *KAL1* o *Mbp* se determinó usando el método comparativo del ciclo umbral (Ct) y sus valores se normalizaron respecto a la expresión del ARNm de *gapdh* para representar los resultados como  $\Delta\text{Ct}$ , tal y como se describe en el manual de usuario del equipo ABI PRISM. La expresión relativa de *KAL1* fue normalizada con el fundador que menos expresaba. La expresión relativa de *Mbp* en los ratones A1 fue calculada normalizando el nivel de expresión encontrado en los animales +/- para cada edad estudiada. Para cada gen, al menos tres réplicas por muestra fueron realizadas en tres animales diferentes.

#### 2.1.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

Mediante este análisis se valoró la presencia de la proteína GFP como reportero y se estudió la expresión de la proteína MBP en los animales A1. Los hemiserebros fueron disecados a P0, P15, P30 y P90 y homogeneizados en tampón de lisis [Nonidet P-40, *cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche) en PBS (1X)] mediante una jeringa de insulina de 1 mL con una aguja de 20G. El extracto fue incubado durante 30 minutos en hielo y centrifugado posteriormente a  $16,000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue recogido y la concentración de proteínas se determinó por el método BCA (Pierce). Los extractos de proteína (10-30  $\mu\text{g}$ ) fueron hervidos en tampón 2X de Laemli (Sigma-Aldrich) y se utilizaron directamente para *Western blot*. La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond-ECL) y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-GFP (ab6673 Abcam), anti- $\alpha$ -tubulina (T5168 Sigma-Aldrich) y anti-MBP (ab7349 Abcam). Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano se detectaron por quimioluminiscencia enzimática (ECL). Para cuantificar la cantidad de MBP, llevamos a cabo un *Western blot* usando un escáner *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR) para el análisis simultáneo de dos proteínas

diferentes en canales fluorescentes separados. Los anticuerpos secundarios conjugados con 680 o 800 IRDye nos permitieron escanear las membranas en el escáner *Odyssey infrared scanner* (LI-COR) y las bandas para MBP y  $\alpha$ -tubulina fueron analizadas siguiendo las instrucciones del fabricante para el *Odyssey*. Se representan los valores para la cantidad relativa de MBP con respecto de la cantidad total de  $\alpha$ -tubulina, normalizada contra el valor de MBP/ $\alpha$ -tubulina para los ratones control.

### 2.1.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para la microscopía electrónica (ME), los ratones fueron anestesiados y perfundidos intracardíacamente con PBS, seguido de PFA al 4% y glutaraldehído al 1% en PB, e incubados en el mismo fijador toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron en PB durante dos horas y se crioprotegieron en PB más sacarosa 1M. Las secciones coronales fueron cortadas mediante un microtomo de vibración (Leica) a 60  $\mu$ m de grosor. Tras varios lavados en PB, las secciones fueron postfijadas en tetraóxido de osmio al 1% en PB y bloqueadas con acetato de uranilo al 1% en agua destilada. Luego fueron deshidratadas en una serie de etanoles ascendentes hasta el 100% seguido de óxido de propileno y embebidos en la resina epoxy Durcupan (Fluka). El cuerpo calloso fue cortado a 70-90 nm en un ultramicrotomo (Reichert Ultracut E; Leica). Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de níquel y se incubaron en gotas de citrato de plomo (preparado según el método de Reynolds) a temperatura ambiente. El análisis ultraestructural fue llevado a cabo en un microscopio electrónico Jeol-1010.

### 2.1.7. ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICO DE LA VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN DE LOS AXONES DEL CUERPO CALLOSO *IN VIVO*.

La estimulación y el registro electrofisiológico fueron realizados *in vivo* durante la cirugía en machos +/+ y A1 bajo condiciones estables de temperatura y humedad. A los animales, una vez anestesiados con hidrato de cloral al 4%, se les implantaron estereotáxicamente los electrodos de registro (+1.5 mm lateral y 1.34 mm posterior a bregma; Paxinos and Franklin 2001) y estimulación (-1.5 mm lateral y 1.34 mm posterior a bregma). Estos electrodos fueron realizados con un cable de tunsgeno cubierto con 50  $\mu$ m de Teflón (Advent Research Materials). La estimulación consistió en pulsos pareados de 2 a 500 ms de intervalo entre estímulos (bifásico, positivo-negativo, 100  $\mu$ s de duración) presentados a intensidades crecientes (de 0,4 mA a 1,2 mA) con la ayuda de un estimulador digital (CS-20, Cibertec) dotado de una unidad de aislamiento (ISU-220, Cibertec). El registro de la respuesta eléctrica fue recogido por un amplificador diferencial Grass P511 con un ancho de banda de 0,1 Hz-10 kHz (Grass-Telefactor, West Warwick) y con una sonda de alta impedancia ( $2 \times 10^{12} \Omega$ , 10 pF).

### 2.1.8. ANÁLISIS CUANTITATIVO Y ESTADÍSTICO

**Ensayos de quimiotaxis:** Tras la inmunocitoquímica, el marcaje celular fue examinado en el IN Cell Analyzer 1000 (GE-HealthCare) con el cual se adquirieron 16 microfotografías de cada membrana al azar. Para cuantificar la quimioatracción, el número de OPCs transmigrados por campo fue cuantificado utilizando el software IN Cell Analyzer 1000 Workstation (GE-HealthCare). Los datos se representan como el porcentaje de OPCs migrados por campo respecto al número de células de los animales control considerados como 100%.

**Microscopía electrónica:** El grosor de la vaina de mielina en los axones del cuerpo caloso fue determinado mediante el análisis de la g-ratio (diámetro del axón/ diámetro del axón + diámetro de la vaina de mielina). Se representa el diagrama de dispersión de la distribución de la g-ratio en función del diámetro del axón. El porcentaje de axones mielinizados también fue cuantificado. Al menos 200 axones fueron analizados por animal, para un total de 3 animales por genotipo.

Los datos generales son representados como la media  $\pm$  el error estándar (ES). Los análisis se han llevado a cabo de acuerdo con los test estadísticos de la *t* de Student correspondientes para muestras independientes, análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos colas, o sus correspondientes tests por rangos para muestras no paramétricas. El análisis estadístico de los resultados cuantitativos fue realizado con el paquete informático *Software Package Sigmastat-Sigmaplot (SPSS Inc.)*. Los niveles de significación mínimos estadísticos se definieron como significativos para \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

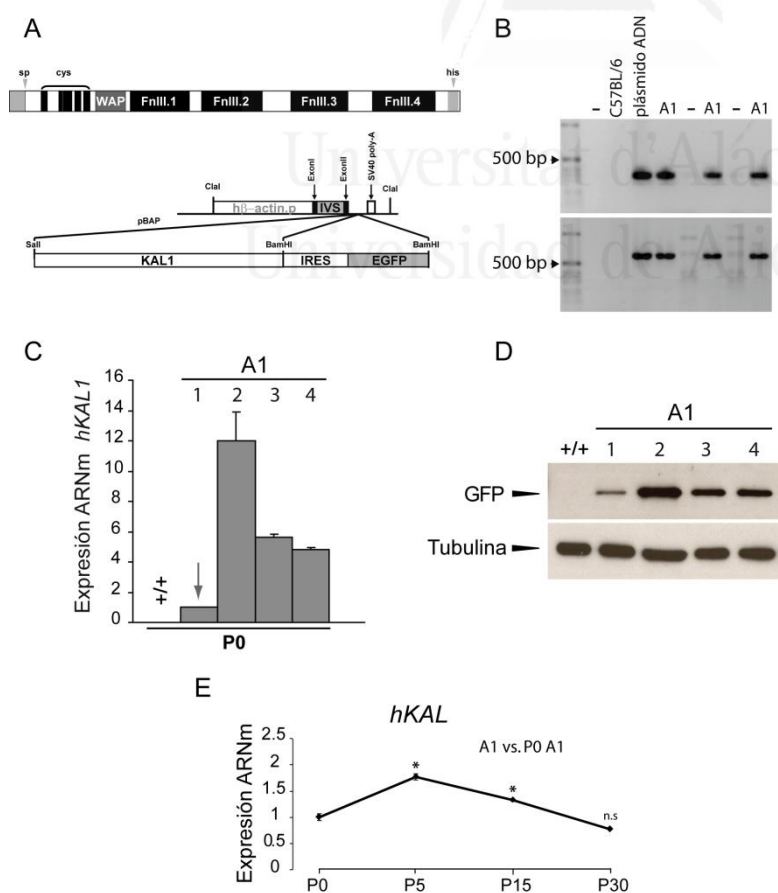


Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 2.2. RESULTADOS

### 2.2.1. Generación de la línea de ratón transgénico que sobreexpresa anosmina-1

Con el objetivo de definir el papel que desempeña la proteína anosmina-1 en el SNC, generamos una nueva línea de ratón transgénico que sobreexpresa el ADNc humano para el gen *KAL1* bajo el control del promotor de la  $\beta$ -actina seguido de una secuencia IRES y el ADNc para la *EGFP* como reportero (**Figura 8A**). Los ratones transgénicos eran viables, fértiles y transmitieron el transgén. La inserción de los genes *EGFP* y *KAL1* fue confirmada mediante el genotipado por PCR a partir del ADN genómico extraído de la cola de estos ratones (**Figura 8B**). Para confirmar la expresión del ARNm para *KAL1* humano y valorar el nivel de expresión en las diferentes líneas de ratones transgénicos fundadores, realizamos una qRT-PCR utilizando ADNc amplificado a partir del ARNm del cerebro, con una sonda Taqman específica para *KAL1* humano. Los resultados confirmaron que los ratones transgénicos expresaban el ADNc humano para *KAL1* en diferentes niveles, mientras los ratones controles no lo expresaron (**Figura 8C**). Cuando la expresión de la proteína GFP fue analizada en estos mismos animales mediante *Western blot*, encontramos que la expresión de GFP era paralela a la expresión del ARNm de *KAL1* (**Figura 8C,D**).



**Figura 8. Generación de una línea de ratón transgénico que sobreexpresa anosmina-1.** El ADNc del gen *KAL1* humano fue insertado en el vector pBAP bajo el control del promotor de la  $\beta$ -actina, seguido de una secuencia IRES y el gen *EGFP* como reportero (**A**). El genotipado mediante PCR confirmó la presencia tanto de los ADNc para *KAL1* como para *EGFP* (**B**). Para la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), se extrajo el ARNm de los hemisferios de diferentes líneas de ratones transgénicos a P0. El análisis cuantitativo se llevó a cabo para la secuencia humana de *KAL1* y el gen *gapdh* de ratón fue usado como control endógeno. La expresión relativa fue normalizada con respecto a la línea de transgénicos que mostraron el nivel de expresión más bajo, considerado como 1 (**C**). El *Western blot* indicó que la expresión de GFP es igual a la expresión de ARNm para *KAL1* (**D**). La máxima expresión del ARNm para *KAL1* fue alcanzada a P5 en los ratones A1 con respecto a su P0 (**E**). ANOVA: \* $p < 0,05$ ; ns: no significativo.

Después de cruzar los animales transgénicos con ratones C57BL/6, determinamos que la expresión del transgén era estable y la línea que expresaba el mayor nivel de ARNm para *KAL1*, comparado con el resto de las líneas, fue utilizada para generar el resto de la colonia de animales transgénicos. Para analizar el patrón temporal de la expresión de anosmina-1 en los ratones transgénicos, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *KAL1* con el valor correspondiente a los animales a la edad de P0. Los ratones transgénicos A1 a P5 y P15 presentaron un incremento en la expresión de anosmina-1 (Figura 8E).

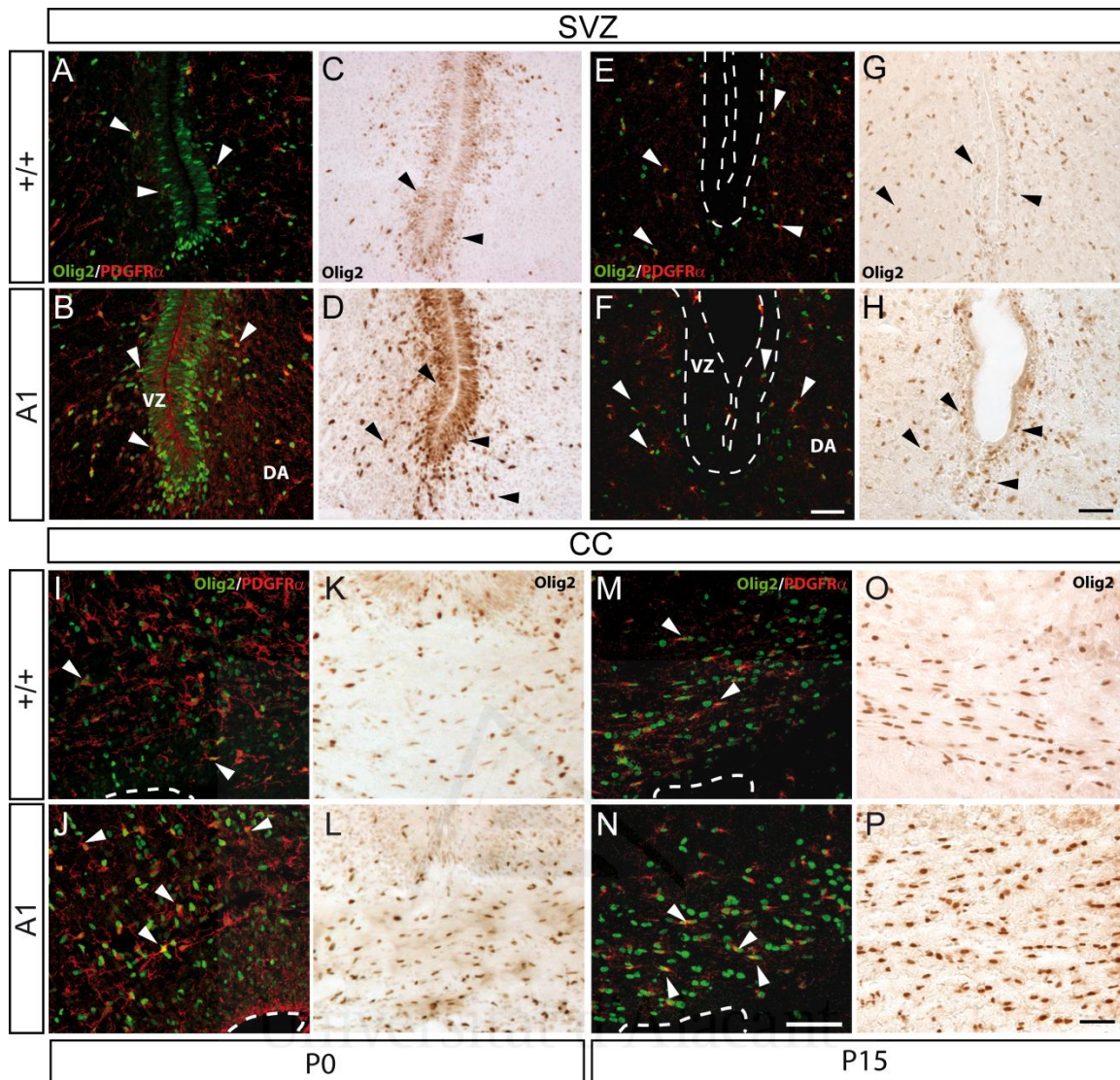
### 2.2.2. La sobreexpresión de anosmina-1 incrementa el número de OPCs

Los animales transgénicos A1 no mostraron diferencias macroscópicas significativas comparados con los animales control, desde la edad embrionaria E16.5 hasta el adulto (datos no mostrados). Sin embargo, el análisis inmunohistológico reveló un incremento en el número de OPCs (Tabla 1 y Figura 9A-H) en la zona ventral de la SVZ (VZ) — una de las principales regiones del cerebro que dan lugar a las células de la línea oligodendroglial (Aguirre et al. 2004; Menn et al. 2006) — así como en un tracto altamente mielinizado como el cuerpo caloso (CC; Tabla 1 y Figura 9I-P) en los ratones que sobreexpresan A1. Este incremento en el número de OPCs fue observado desde la edad E16.5 hasta el adulto temprano (P30), observándose las mayores diferencias a P0 y P15 (Tabla 1 y Figura 9). Además, el número de OPCs fue significativamente mayor alrededor de la SVZ, zona a la que hemos denominado como área de dispersión (DA; Tabla 1 y Figura 9A-H) y en el cuerpo caloso de los animales A1 en comparación con los ratones control (Tabla 1 y Figura 9I-P).

Células Olig2 <sup>+</sup> /10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>	VZ		DA		CC	
	+/+	A1	+/+	A1	+/+	A1
<b>E16.5</b>	24,03±2,01	35,54±0,83(***)	0,49±0,09	1,72±0,2(***)	-	-
<b>P0<sup>a</sup></b>	5,02±0,51	21,74±0,72(***)	0,93±0,16	3,83±0,19(***)	1,06±0,17	2,25±0,15(***)
<b>P5</b>	5,13±0,8	11,65±0,8(***)	1,7±0,15	3,26±0,19(***)	2,95±0,24	3,6±0,24(*)
<b>P15<sup>a</sup></b>	0,83±0,19	2,69±0,27(***)	0,52±0,06	2,15±0,12(***)	1,35±0,15	3,96±0,24(***)
<b>P30</b>	0,78±0,14	1,74±0,22(**)	0,75±0,08	1,58±0,08(***)	4,5±0,31	5,6±0,31(**)

**Tabla 1. Cuantificación del número de OPCs en la SVZ y el cuerpo caloso durante el desarrollo.** Se representa la media del número de células Olig2<sup>+</sup> /10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup> ± ES. Test *t* de Student: \*, *p*<0,05; \*\*, *p*<0,01; \*\*\*, *p*<0,001. <sup>a</sup> Imágenes ilustrativas de la SVZ a P0 y P15 se muestran en la Figura 9.





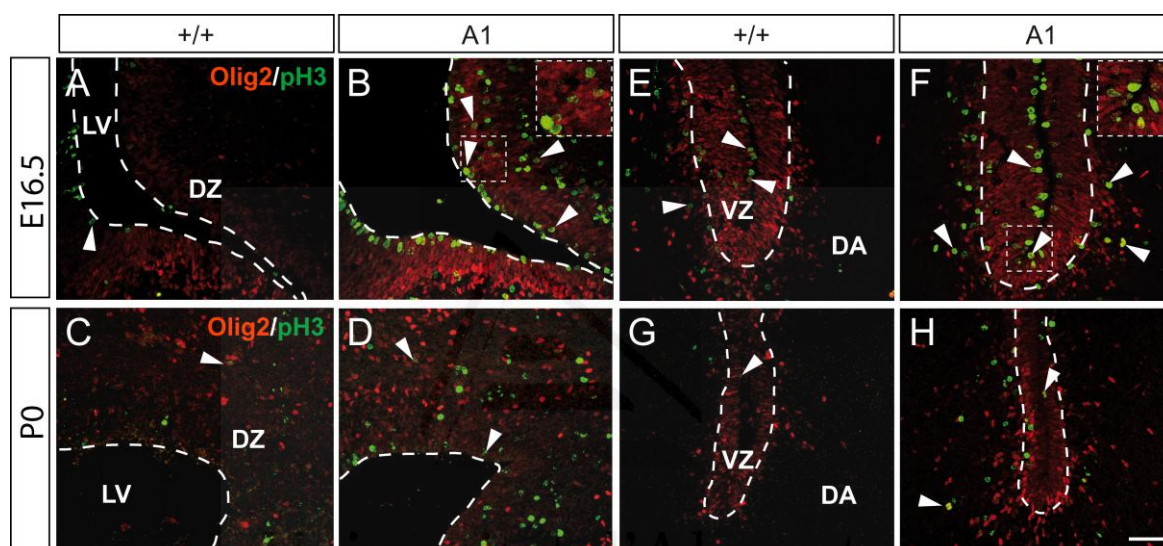
**Figura 9. La sobreexpresión de anosmina-1 aumenta el número de OPCs en la SVZ y en el cuerpo calloso durante el desarrollo.** Secciones coronales del cerebro fueron marcadas con Olig2/PDGFR $\alpha$  y las imágenes tomadas con microscopía confocal ilustran las células doblemente positivas a estos anticuerpos en la SVZ a P0 (A,B) y a P15 (E,F), y en el cuerpo calloso (CC) a P0 (I,J) y P15 (M,N). Los OPCs fueron cuantificados en las secciones marcadas con Olig2 a E16.5 (Tabla 1), P0 (SVZ:C,D; CC:K,L), P5 (Tabla 1), P15 (SVZ:G,H; CC:O,P) y P30 (Tabla1), donde los ratones transgénicos A1 presentaron un incremento en el número de OPCs en la zona de oligodendroglíogenesis (VZ), en el área de dispersión (DA) y en el cuerpo calloso (CC) con respecto a los ratones control. La barra de escala representa 50  $\mu$ m.

Para estudiar si el incremento de los OPCs era debido a un aumento de la proliferación de este tipo celular, el número total de células Olig2<sup>+</sup>/pH3 fue cuantificado en la SVZ a E16.5 y P0 (Tabla 2 y Figura 10A-H), el periodo más activo de oligodendroglíogenesis (Kessaris et al. 2006). Encontramos que la proliferación de los OPCs estaba incrementada en la SVZ dorsal (DZ; Tabla 2 y Figura 10A,B,E,F), en la SVZ ventral (VZ) y en la zona de dispersión alrededor de la SVZ (DA; Tabla 2 y Figura 10C,D,G,H) en los animales A1 a estas edades en comparación con los controles.



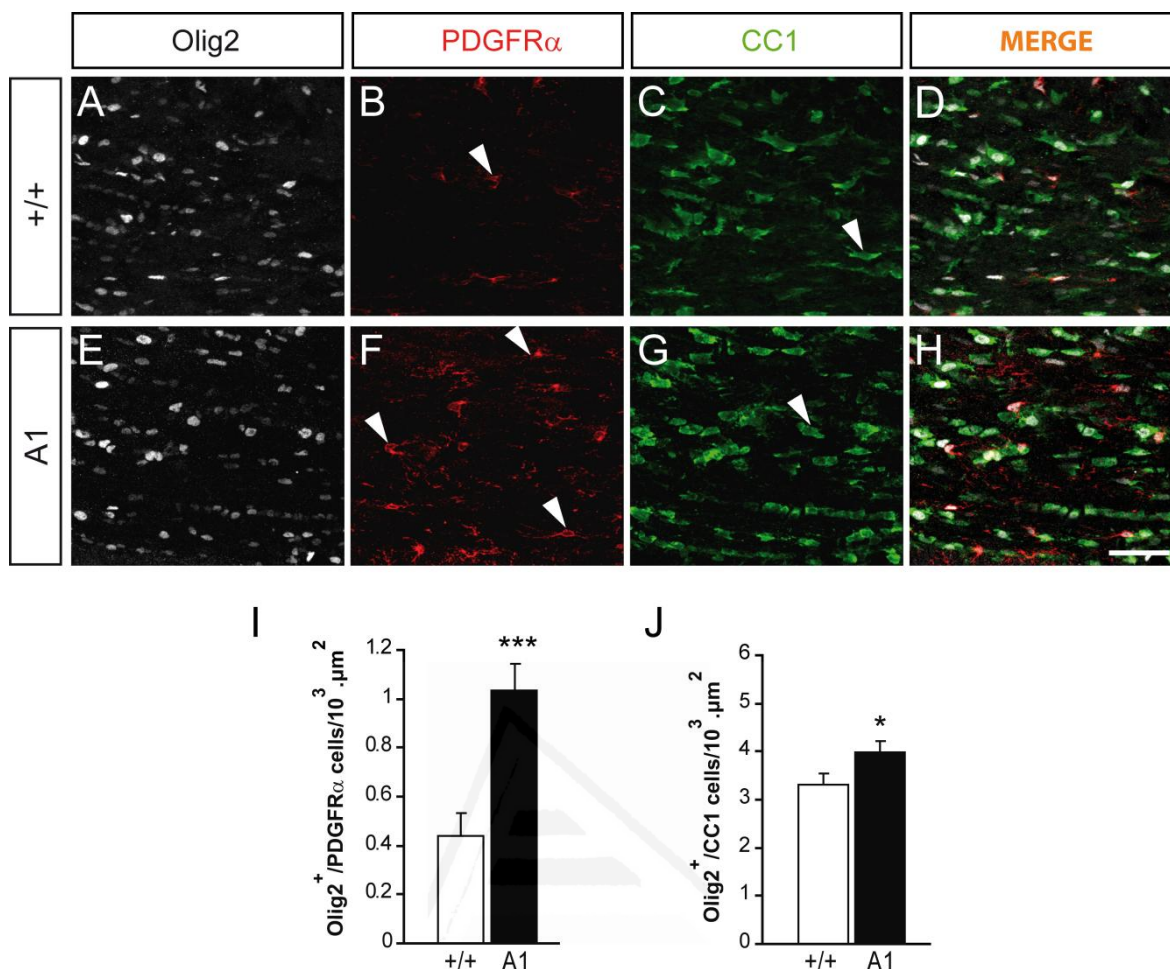
Células Olig2 <sup>+</sup> pH3/ 10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>	DZ		VZ		DA	
	+/+	A1	+/+	A1	+/+	A1
E16.5 <sup>a</sup>	0,1±0,07	1,63±0,2(***)	0,15±0,09	1,5±0,3(***)	0,03±0,03	0,8±0,12(***)
P0	0,04±0,04	0,4±0,11(**)	0,2±0,07	1,23±0,2(***)	0,02±0,02	0,8±0,13(***)

**Tabla 2. Cuantificación del número de OPCs proliferando en la SVZ.** Se representa la media del número de células Olig2<sup>+</sup>pH3 / 10<sup>3</sup>μm<sup>2</sup> ± ES. Test *t* de Student: \*, *p*<0,05; \*\*, *p*<0,01; \*\*\*, *p*<0,001. <sup>a</sup> Imágenes ilustrativas a E16.5 y P0 de la SVZ se muestran en la Figura 10. .



**Figura 10. La proliferación de los OPC se ve incrementada en los animals transgénicos A1.** Las imágenes capturadas de la region dorsal de la SVZ (DZ) a E16.5 (A,B) y P0 (C,D) y de la región ventral de la SVZ (VZ) a E16.5 (E,F) y P0 (G,H), mostraron las células Olig2/pH3 positivas (indicadas con puntas de flecha) en la DZ (A-D) y la VZ (E-H). La proliferación de estas células se vio incrementada en estas regiones en los ratones transgénicos A1 con respecto a los controles +/+ (Tabla 2). La barra de escala representa 50 μm.

Para estudiar la diferenciación de los OLs *in vivo*, cuantificamos el número de células doblemente marcadas con Olig2/PDGFR $\alpha$ , para identificar OPCs, y Olig2/ $\alpha$ CC1, para OLs maduros, en el cuerpo calloso a P30. En los animales transgénicos, tanto la subpoblación de células Olig2<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> (Figura 11A-I) como las células Olig2<sup>+</sup>/ $\alpha$ CC1<sup>+</sup> (Figura 11A-H, J) fue mayor que en los ratones control, lo que sugiere que el alto número de OPCs detectados en los estadios tempranos del desarrollo dan lugar a un mayor número de OLs en el adulto (P30). Por lo tanto, la sobreexpresión de anomina-1 da lugar a un incremento de la oligodendroglíogenesis, con un mayor número de OPCs y OLs en comparación con los animales +/+.

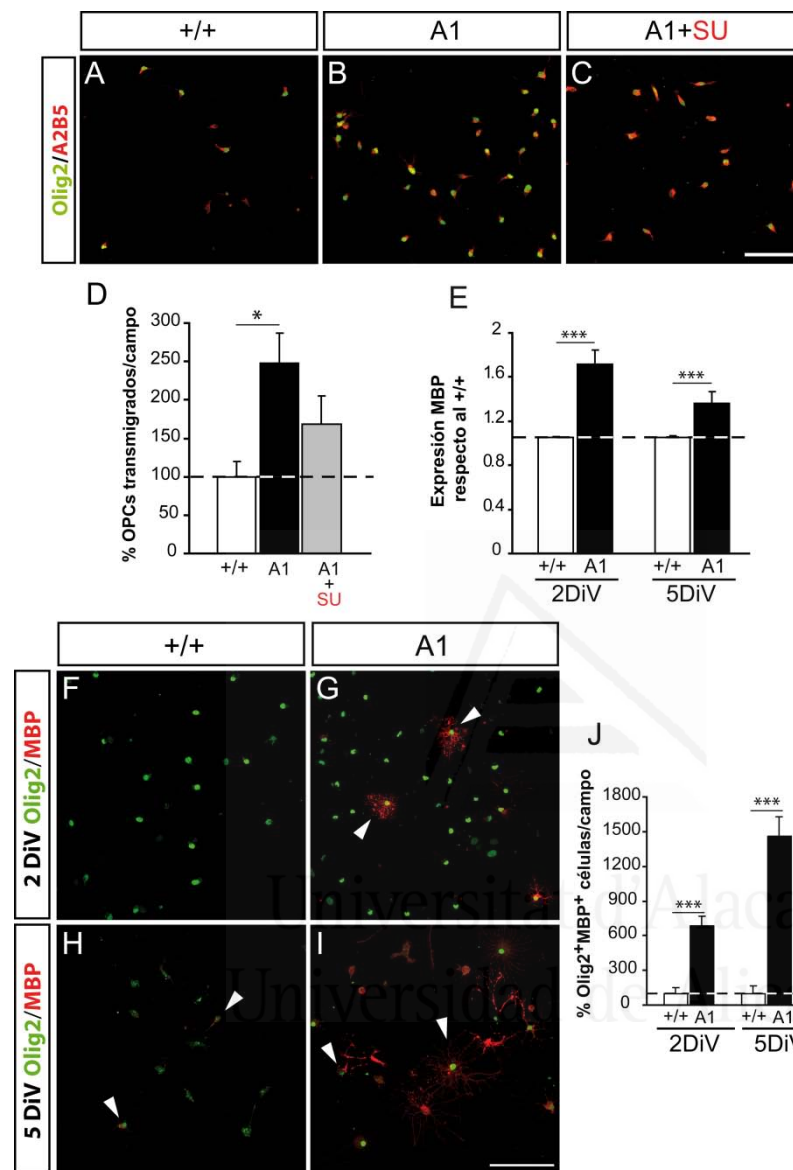


**Figure 11. Anosmina-1 incrementa el número de OPCs y OLs en el cuerpo calloso.** Las secciones coronales de cerebros de animales P30 fueron marcadas con los anticuerpos Olig2/PDGFR $\alpha$ / $\alpha$ CC1 y las células positivas fueron cuantificadas. El número de OPCs Olig2<sup>+</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> (A-I) y OLs Olig2<sup>+</sup>/ $\alpha$ CC1<sup>+</sup> (A-H,J) fue significativamente mayor en los ratones A1 con respecto a los controles. Test *t* de Student: \**p*<0,05; \*\*\**p*<0,001. La barra de escala representa 50  $\mu$ m.

### 3. La sobreexpresión de anosmina-1 contribuye a la migración y diferenciación de los OPCs *in vitro*.

Como ya había sido demostrado, el bloqueo de la proteína anosmina-1 endógena expresada por los OPCs dificulta su migración (Bribián et al. 2008). Por esta razón estudiamos el efecto de la sobreexpresión de anosmina-1 en la migración de los OPCs mediante cámaras de quimiotaxis. En estos ensayos observamos que la capacidad de migración de los OPCs purificados a partir de las cortezas cerebrales de los animales transgénicos A1 a P0 estaba incrementada en comparación con los OPCs purificados de animales controles (**Figura 12A-C**), confirmando que la proteína anosmina-1 endógena, expresada por estas células, está implicada en su migración como ya se había descrito (Bribián et al. 2008). El tratamiento de los OPCs purificados de los animales transgénicos con el bloqueante de los receptores FGFR SU5402, reduce, aunque no hasta niveles

control, la capacidad de migración de estas células, sugiriendo un mecanismo independiente de FGFR1 (**Figura 12C-D**).



**Figura 12. Efecto de anosmina-1 en la migración y diferenciación de los OPCs *in vitro*.** En los ensayos de quimiotaxis se evaluó la capacidad de migración de los OPCs por la presencia de células A2B5/Olig2<sup>+</sup> al lado opuesto de la membrana. La sobreexpresión de anosmina-1 por los OPCs purificados de los ratones A1 incrementa la migración de estas células en comparación con los OPCs purificados de ratones C57BL/6 (**A-D**). Este efecto puede estar mediado parcialmente vía FGFR1, puesto que el bloqueante SU5402 reduce la migración pero no la suprime completamente (**C,D**; ANOVA: \*,  $p < 0,05$ ). La barra de escala representa 60  $\mu\text{m}$ . Los OPCs purificados de ratones transgénicos y controles se cultivaron en placas P96 en medio de diferenciación. El análisis mediante *In-Cell Western* reveló que tras 2 o 5 DIV los OPCs derivados de ratones transgénicos A1 expresan mayor cantidad de la proteína MBP que los OPCs de ratones control *in vitro*. Se representa la cantidad relativa de MBP con respecto a la cantidad total de  $\alpha$ -tubulina, normalizada con respecto al valor de MBP/ $\alpha$ -tubulina para los OPCs control  $\pm$  ES (**E**). El número de células Olig2/MBP<sup>+</sup> fue cuantificado tras 2 o 5 DIV en medio de diferenciación (**F-J**). Test *t* de Student: \*\*\*  $p < 0,001$ ). La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ .

Puesto que los OLs son las células responsables de la formación de las proteínas de la vaina de mielina que recubre los axones, llevamos a cabo cultivos de OPCs purificados a partir de las cortezas cerebrales de animales control y A1 a P0 para estudiar la expresión de la proteína MBP como marcador de la diferenciación oligodendroglial. El análisis mediante *In-Cell Western* indicó que tras 2 o 5 DIV, los OPCs purificados de ratones A1 mostraron niveles más elevados de proteína MBP en comparación con los OPCs purificados de animales control (**Figura 12E**).

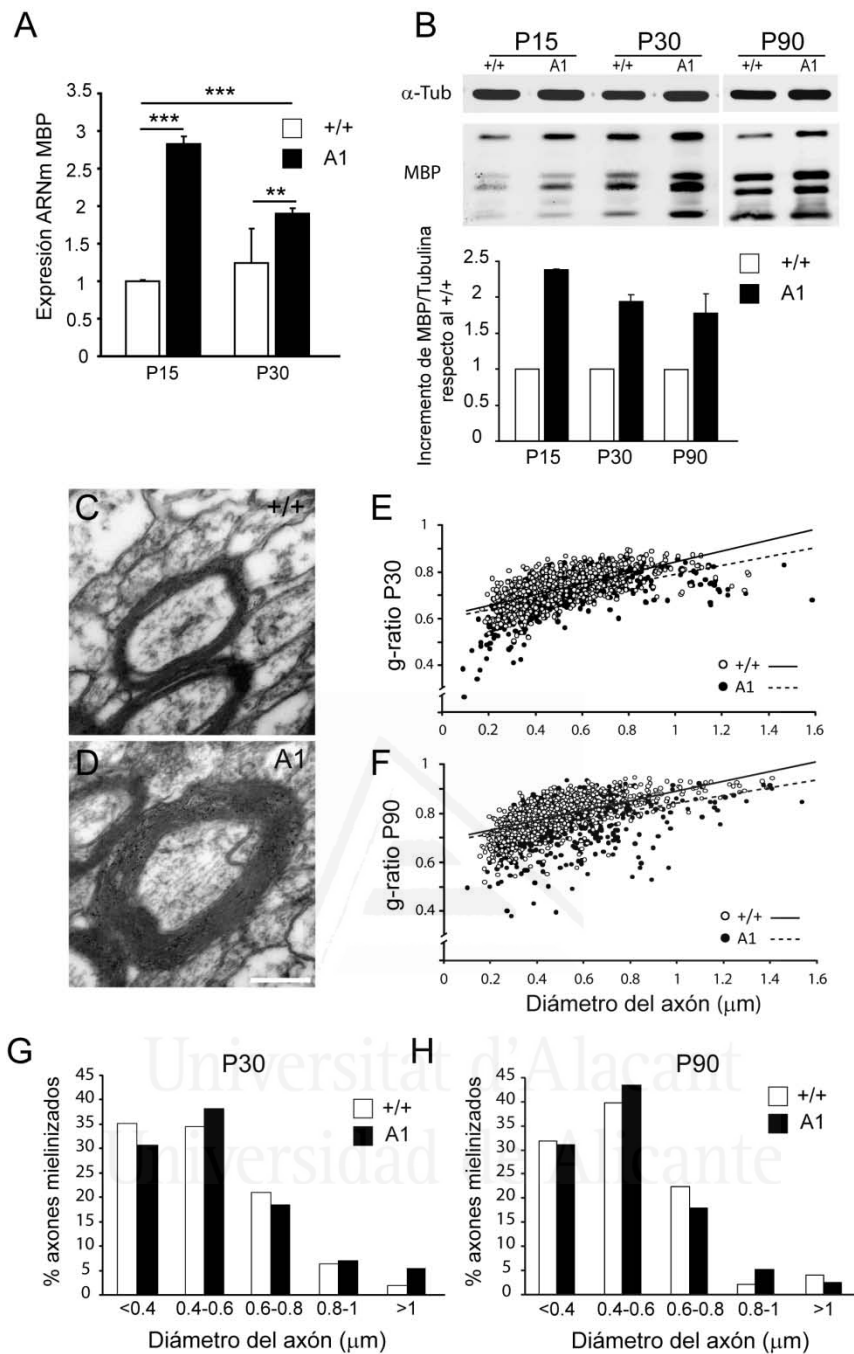
Cuando los OPCs fueron cultivados sobre cubreobjetos en medio de diferenciación, tras 2 o 5 DIV, los OPCs derivados de los animales transgénicos mostraron un aumento en el número de células positivas Olig2/MBP (**Figura 12F-I**). Las características morfológicas típicas de un OL maduro, con una alta complejidad de procesos, fueron observadas principalmente en los cultivos celulares de los animales A1 (**Figura 12G,I**). Estos datos sugieren que la sobreexpresión de anosmina-1 promueve la diferenciación de los OPCs hacia un fenotipo de OL formador de mielina *in vitro*.

#### **2.2.4. Anosmina-1 incrementa la expresión de la proteína MBP y el grosor de la vaina de mielina en los axones del cuerpo calloso.**

Los ratones transgénicos mostraron un incremento en el número de células Olig2<sup>+</sup> *in vivo* y un incremento en la cantidad de proteína MBP *in vitro*, por lo que examinamos en el cerebro de estos animales si los niveles de ARNm para *Mbp*, como marcador de la mielinización, se correlacionaban con esta observación, y si el incremento en el número de OPCs y OLs podría estar asociado con cambios en el proceso de mielinización. Cuando analizamos la expresión del ARNm para *Mbp* a P15 y P30 observamos que los niveles de *Mbp* a P15 — el periodo más activo de mielinización (Lu et al. 2005; Flores et al. 2008) — era significativamente más elevado en los ratones transgénicos que en los controles. A P30, cuando el proceso de mielinización del cerebro durante el desarrollo ya ha finalizado, los niveles de ARNm para *Mbp* todavía eran más altos en los animales transgénicos A1 (**Figura 13A**). Estos resultados fueron confirmados por *Western blot* para la proteína de mielina MBP en hemisferios homogeneizados de animales a P15 y P30. La cuantificación de la proteína MBP a ambas edades mostró que los animales transgénicos tenían más MBP que los controles, incremento que se mantiene hasta P90 (**Figura 13B**).

El incremento del número de OPCs y OLs, sumado a un aumento en la expresión del ARNm y la proteína para MBP observados en los ratones transgénicos, nos llevó a analizar la ultraestructura de la mielina mediante microscopía electrónica (ME) en secciones transversales del cuerpo calloso de estos ratones a P30 y P90 (**Figura 13C,D**). El análisis ultraestructural reveló un incremento en el grosor de la vaina de mielina tras la cuantificación de la g-ratio en los ratones A1 ( $0,704 \pm 0,003$ ) comparado con los animales control ( $0,727 \pm 0,003$ ; *t* de Student; *n*=3 animales por genotipo).





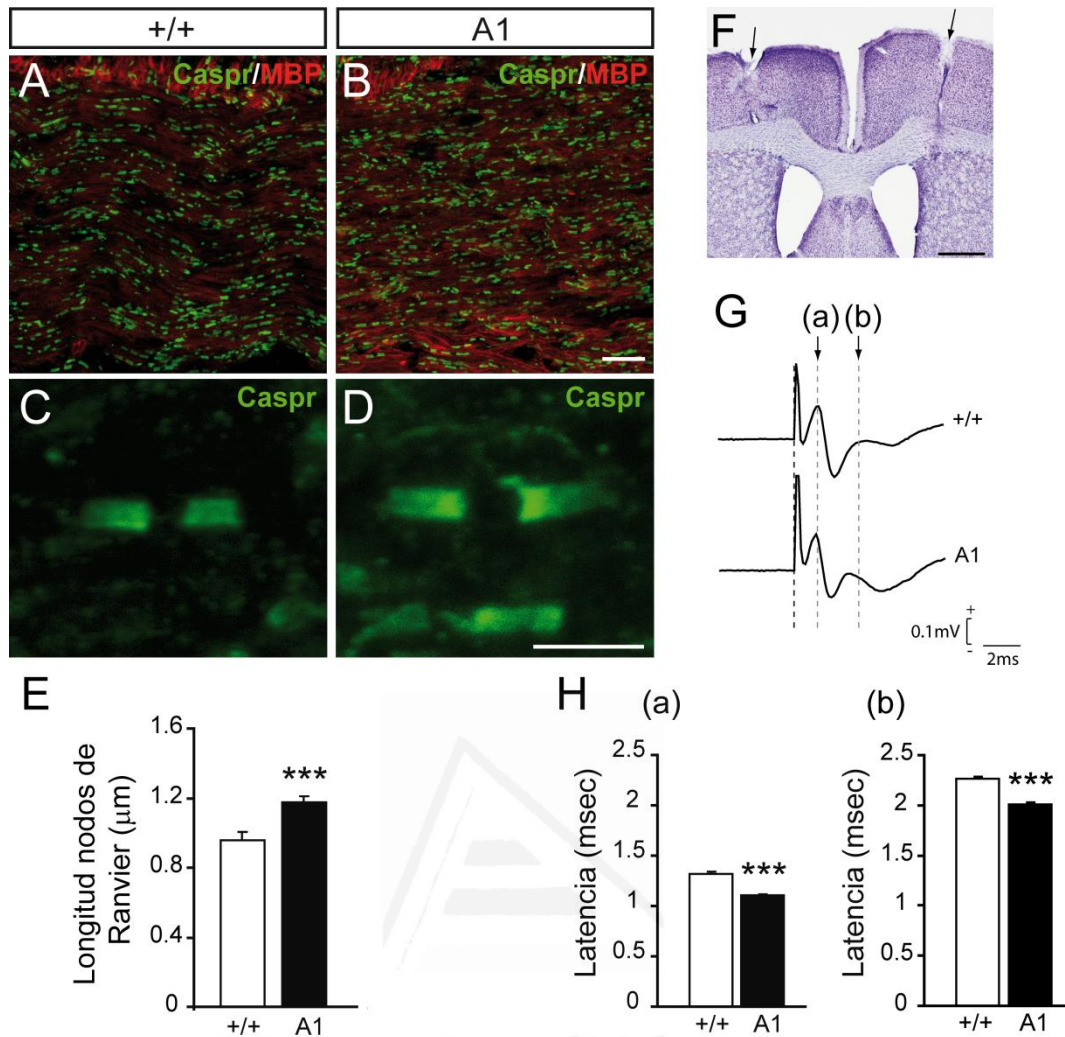
**Figura 13. La sobreexpresión de anosmina-1 incrementa la producción de mielina.** Para la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se utilizó el ADNc obtenido a partir de ARNm de hemicerebros de ratones a P15 y P30. Los animales +/+ a P15 se usaron para normalizar la expresión relativa. La expresión del ARNm para *Mbp* fue significativamente mayor a P15 y P30 en los ratones A1 con respecto a los controles ( $n=4$  animales por edad y genotipo). Test *t* de Student: \*\*,  $p<0,01$ ; \*\*\*,  $p<0,001$  (A). Los hemicerebros de los ratones +/+ y A1 fueron analizados mediante *Western blot* a P15, P30 y P90 ( $n=3$  animales por edad y por genotipo). Se cuantificó la expresión de MBP de los animales A1 respecto a los +/+, normalizando respecto a la cantidad de  $\alpha$ -tubulina utilizada como control de carga. La expresión de la proteína MBP está incrementada en los ratones A1 a las edades estudiadas. Las bandas de MBP y  $\alpha$ -tubulina fueron analizadas con el *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR) y se representan los valores de la cantidad relativa de MBP con respecto al total de  $\alpha$ -tubulina, normalizados con respecto al valor MBP/ $\alpha$ -tubulina para los ratones control  $\pm$  ES (B). Imágenes de microscopía electrónica que muestran los axones del cuerpo calloso a P30. La barra de escala representa  $0,25\mu\text{m}$  (C,D). La cuantificación del grosor de la vaina de mielina en este tracto a P30 y P90 mediante el análisis de la g-ratio de los axones mielinizados en función del tamaño del axón mostró diferencias significativas entre los animales transgénicos (círculos negros, A1) y los animales control (círculos blancos, +/+) (E,F), independientemente del calibre del axón (ANOVA de dos colas,  $p<0,05$ ). No se observaron diferencias en el porcentaje de axones mielinizados (G,H). El número de axones analizados fue aproximadamente de 615 de un total de 3 animales por genotipo.

El diagrama de dispersión de la distribución de la g-ratio en función del diámetro del axón indicó una hipermielinización en los axones de los ratones A1, corroborado por la disminución de la g-ratio en estos animales en comparación con los animales +/+. La media del diámetro axonal fue invariable ( $0,543 \pm 0,01$  en A1, comparado con un valor de  $0,512 \pm 0,008$  para los animales control;  $n=3$  animales por genotipo), y no se observaron diferencias en el porcentaje de axones mielinizados y no mielinizados (**Figura 13E,G**). El análisis de la g-ratio en los ratones adultos a P90 siguió mostrando esta hipermielinización en los axones del cuerpo calloso de los ratones transgénicos. A esta edad la g-ratio fue de  $0,757 \pm 0,004$  en los ratones A1, significativamente menor que el valor para los ratones control  $0,816 \pm 0,005$  ( $n=3$  animales por genotipo). El diagrama de la distribución de la g-ratio en función del diámetro del axón confirmó de nuevo la hipermielinización en los ratones A1 a P90, sin variar la media del diámetro del axón ( $0,512 \pm 0,007$  en los ratones A1, comparado con los ratones control  $0,523 \pm 0,01$ ;  $n=3$  animales por genotipo; **Figura 13F**) y no se observaron diferencias en el porcentaje de axones mielinizados y no mielinizados (**Figura 13H**).

#### **2.2.5. La sobreexpresión de anosmina-1 modifica la longitud nodal y la velocidad de conducción de los axones del cuerpo calloso.**

El análisis mediante microscopía confocal de secciones transversales del cuerpo calloso en cerebros adultos (P60) marcadas con el anticuerpo anti-Caspr (localizado en los paranodos) reveló que los nodos de Ranvier eran más largos en los ratones A1, aproximadamente  $0,2 \mu\text{m}$ , es decir, en torno a un 25-30% más largos con respecto a los animales control (**Figura 14A-E**). Sin embargo, no se observaron diferencias en la densidad de nodos de Ranvier como medida indirecta de la longitud internodal (Savvaki et al. 2008), lo que indica que este parámetro no estaría afectado en los animales que sobreexpresan anosmina-1.

El incremento en el grosor de la vaina de mielina con unos nodos de Ranvier más largos nos llevó a investigar si estas alteraciones podrían provocar una conducción anormal del impulso nervioso en el SNC. Para ello, se midió la velocidad de conducción del impulso nervioso a lo largo del cuerpo calloso y observamos que la latencia de la respuesta del impulso eléctrico se encontraba significativamente reducida en los ratones A1 en comparación con los controles +/+ (**Figura 14F-H**).



**Figura 14. Anosmina-1 aumenta la longitud de los nodos de Ranvier así como la velocidad de conducción del impulso nervioso en los axones del cuerpo calloso.** Imágenes de microscopía confocal del cuerpo calloso de ratones control (A,C) y ratones transgénicos A1 (B,D) a P60 marcados con Caspr y MBP. La densidad de los nodos de Ranvier en el cuerpo calloso fue examinada como medida indirecta de la longitud internodal (Savvaki et al., 2008). Un área cuadrada de  $64 \times 64 \mu\text{m}$  se utilizó para contar todos los nodos marcados (A,B), y el anticuerpo Caspr fue usado para marcar la región paranodal de los axones; el análisis se llevó a cabo con el software ImageJ. Los resultados no mostraron diferencias en el número de nodos entre genotipos (+/+,  $176 \pm 17,5$ ; A1,  $179,8 \pm 28,8$ ), indicando que la distancia entre nodos no cambia a pesar del incremento en la longitud nodal observada en los ratones transgénicos (+/+,  $0,97 \pm 0,04$ ; A1,  $1,2 \pm 0,03$ ). La longitud de los nodos de Ranvier se midió en tres animales por genotipo. La barra de escala representa  $20 \mu\text{m}$  (A,B) y  $2,5 \mu\text{m}$  (C,D). Imagen que ilustra la localización de los electrodos en el cuerpo calloso (F). La barra de escala representa  $500 \mu\text{m}$ . Potencial de campo evocado en el cuerpo calloso en los ratones control y transgénicos A1 (G). El histograma representa la latencia de la media del potencial de campo registrado en los tiempos (a) y (b) indicados (H). Test t de Student: \*\*\*,  $p < 0,001$ .



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## ***DISCUSIÓN***



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

En esta tesis hemos realizado la disección de los dominios de la proteína anosmina-1 involucrados en la interacción con el receptor FGFR1, y hemos estudiado cómo la estructura de anosmina-1 influye en su mecanismo de acción. Tanto el gen *KAL1* como el gen *KAL2* están implicados en la patogenia del KS y con este trabajo demostramos que, mutaciones puntuales en el gen *KAL1*, que han sido descritas en pacientes con KS, suprimen la interacción anosmina-1/FGFR1. Además, como consecuencia de estas mutaciones, y de mutaciones de codón de parada, se anula la quimioatracción ejercida por anosmina-1 sobre los neuroblastos de la SVZ a través de FGFR1. De esta forma contribuimos a esclarecer el mecanismo de acción molecular de dos de los genes implicados en el KS.

También hemos comprobado la existencia de interacciones homofílicas anosmina-1/anosmina-1, así como la interacción de anosmina-1 con otras moléculas de la matriz extracelular como fibronectina y laminina, que ya habían sido sugeridas anteriormente (Bribián et al. 2008).

Por otro lado, hemos contribuido a dilucidar el papel desempeñado por la proteína anosmina-1 durante el desarrollo del SNC, ya que uno de los hallazgos más interesantes de esta tesis ha sido el efecto de anosmina-1 en la oligodendrogénesis en una línea de ratón transgénico que sobreexpresa la proteína anosmina-1 humana. Anosmina-1 aumenta la proliferación y la migración de los OPCs, dando lugar a un mayor número de OLs maduros. Como consecuencia del aumento en el número de OLs, se observa un incremento en el grosor de la vaina de mielina que recubre los axones del cuerpo caloso, sin verse afectado por ello el porcentaje de axones mielinizados. Además, se aprecia un aumento significativo en la longitud de los nodos de Ranvier en los ratones transgénicos, pero no de la distancia entre nodos. El análisis de la velocidad de conducción en los axones del cuerpo caloso muestra una disminución de la latencia del impulso nervioso, que puede ser resultado de la hipermielinización y/o de unos nodos de Ranvier más largos.

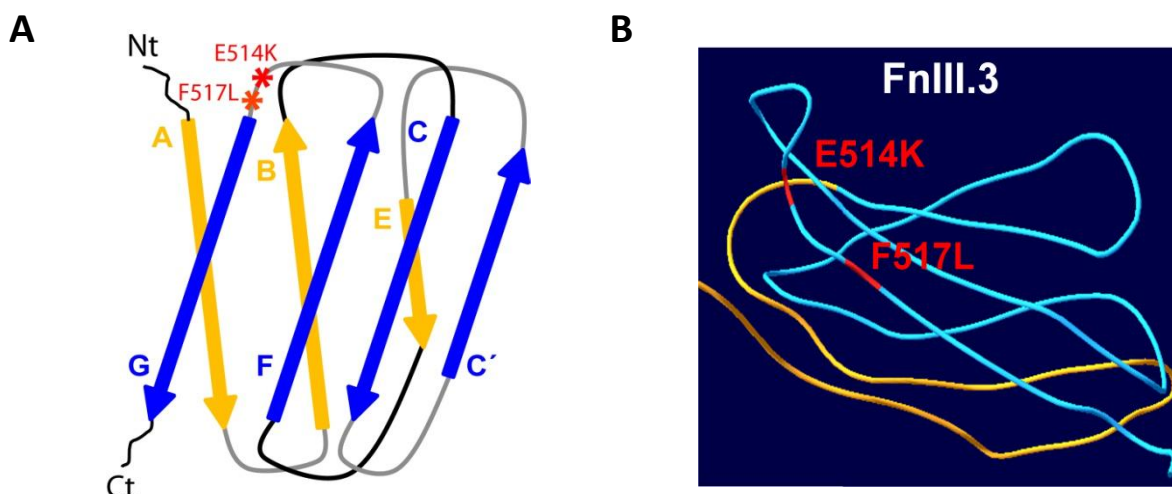
## **1. Interacción entre anosmina-1 con el receptor FGFR1**

El mecanismo de acción de anosmina-1 que ha sido estudiado con más profundidad es su interacción y efecto a través del receptor FGFR1, y la modulación de la activación de este receptor por FGF2 (Ayari y Soussi-Yanicostas 2007; Bribián et al. 2006; Dodé et al. 2003; García-González et al. 2010; González-Martínez et al. 2004; Hu et al. 2009). La interacción entre anosmina-1 y FGFR1 había sido descrita (Ayari y Soussi-Yanicostas 2007; Bribián et al. 2006; González-Martínez et al. 2004), así como que la región N-terminal de anosmina-1 (comprendida por los dominios CR, WAP y FnIII.1) está implicada en la interacción con los dominios extracelulares de FGFR1 D2 y D3 (Hu et al. 2009).

Mediante GST pull-down (GSTpd) hemos demostrado que anosmina-1 es capaz de interactuar con FGFR1 a través de su dominio FnIII.3 y hemos corroborado la interacción descrita entre FGFR1 y la región N-terminal de anosmina-1 (A1Nt) (Hu et al. 2009). Nuestros datos demuestran que los dominios WAP y FnIII.1 juntos se unen a FGFR1, pero no cada uno por separado. Esta interacción se ve disminuida cuando la región rica en residuos de cisteínas (CR) está presente, por lo que sugerimos un papel regulador de este dominio en la interacción anosmina-1/FGFR1. Es posible que la región CR pueda interferir con las propiedades de los dominios FnIII, facilitando o impidiendo la interacción con otras moléculas, tal y como ya ha sido sugerido en otros análisis (Andrenacci et al. 2006).

Estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía han revelado la estructura tridimensional de los dominios FnIII, los cuales se disponen en dos capas de láminas beta antiparalelas ABE/GFCC' (Dickinson et al. 1994; Robertson et al. 2001). Nuestros datos muestran que, la responsable de la interacción con el receptor FGFR1, es la capa compuesta por las láminas GFCC' del dominio FnIII.3 de anosmina-1. Este resultado concuerda con el hecho de que la capa GFCC' presenta una superficie de residuos básicos que podría estar implicada en interacciones proteína-proteína (Chothia y Jones 1997; Dickinson et al. 1994; Robertson et al. 2001).

Varias mutaciones en el gen *KAL1* han sido descritas en pacientes afectados de KS dentro de los dominios FnIII, algunas de las cuales se encuentran en el dominio FnIII.3 (Albuisson et al. 2005; Hardelin et al. 1993a; Hardelin et al. 1993b; Matsuo et al. 2000; Oliveira et al. 2001; Quinton et al. 2001; Sato et al. 2004; Trarbach et al. 2010). Es el caso de dos mutaciones puntuales de cambio de aminoácido, E514K y F517L (Georgopoulos et al. 1997; Maya-Núñez et al. 1998), que se localizan en la capa de láminas beta GFCC' del dominio FnIII.3, cerca de la superficie de residuos básicos (Robertson et al. 2001; Trarbach et al. 2010) (**Figura 15**). La introducción de cualquiera de estas dos mutaciones en el dominio FnIII.3 de anosmina-1 anula la interacción de este dominio con el receptor FGFR1, sugiriendo un papel clave de estos residuos en la interacción anosmina-1/FGFR1. La mutación E514K elimina una carga negativa (glutámico) e introduce un residuo básico (lisina), el cual podría afectar tanto al plegamiento de anosmina-1 como a su función. Por otro lado, la mutación F517L sustituye un voluminoso residuo hidrofóbico (fenilalanina) por uno más pequeño (leucina), lo que provoca un acercamiento con la capa de residuos básicos en el dominio FnIII.3 que puede afectar a la interacción hidrofílica de anosmina-1 con sus ligandos (Robertson et al. 2001). El hecho de que se haya descrito mediante SPR una interacción débil de la proteína anosmina-1 completa, que contiene cualquiera de estas mutaciones, con el receptor FGFR1 (Hu et al. 2009), aunque sea aparentemente contradictorio, puede ser explicado con nuestros datos, ya que la proteína mutada podría perder parte de su capacidad de unión a FGFR1 a través del dominio FnIII.3, manteniendo todavía, en parte, la capacidad de unión a través de la región WAP-FnIII.1.



**Figura 15. Estructura del dominio FnIII.3 de anosmina-1.** Dos mutaciones puntuales de cambio de aminoácido en este dominio se localizan en la capa de láminas beta GFCC' (A). Estructura tridimensional del dominio FnIII.3, con la localización de las mutaciones E514K y F517KL descritas en pacientes con KS, representada mediante el programa *Swiss PDB Viewer* (B).

Puesto que la región N-terminal de anosmina-1, comprendida por los dominios WAP-FnIII.1 (A1Nt), es suficiente para interactuar con FGFR1, y que el dominio CR no parece ser un requisito para esta unión, al menos *in vitro*, hemos estudiado otras mutaciones descritas en estos dominios (Andrenacci et al. 2006; Hu et al. 2009). La mutación C172R, localizada en el dominio WAP, ha sido identificada en tres hermanos afectados con KS, y es fisiológicamente relevante ya que perturba uno de los puentes disulfuro Cys<sup>157</sup>-Cys<sup>172</sup>, altamente conservados en la proteína (Hu et al. 2004; Oliveira et al. 2001; Robertson et al. 2001). De hecho, esta mutación afecta al crecimiento de neuritas en una línea celular derivada de neuroblastos del epitelio olfativo de humanos (González-Martínez et al. 2004). Nuestros datos indican que esta mutación no impide la interacción con el receptor FGFR1, como ya se había descrito que esta mutación no afecta a la unión de anosmina con heparina (Hu et al. 2004).

Sin embargo, nuestros resultados también muestran que la sustitución N267K en el dominio FnIII.1, descrita en pacientes con KS, sí reduce la capacidad de unión de anosmina-1 a FGFR1 (Hu et al. 2009). Esta mutación suprime el efecto sobre la ramificación axonal de anosmina-1 en células del SNC de *C. elegans* (Bülow et al. 2002) e, *in vitro*, esta misma mutación afecta a la migración de las células GN11 inducida por anosmina-1 (Cariboni et al. 2004). La mutación N267K se encuentra adyacente a un sitio de unión a HS y se ha especulado con que podría afectar al plegamiento de la proteína, impidiendo su secreción al medio extracelular, lo que alteraría su función y su unión con FGFR1 (Hu et al. 2009; Robertson et al. 2001).

Tanto en los lisados, como en medios condicionados y en extractos concentrados de la ECM, anosmina-1 y los mutantes A1E514K y A1F517L fueron detectados mediante *Western blot*, descartando así la posibilidad de un defecto en la expresión, procesado o secreción al medio de estas proteínas, lo que coincide con observaciones ya descritas (Cariboni et al. 2004; Robertson et al. 2001), por lo que su presencia en la ECM no se ve

afectada. La proteína A1Nt, el dominio FnIII.3 y el resto de proteínas mutadas estudiadas en esta tesis, también son detectadas mediante *Western blot* en lisados celulares y en el medio condicionado, indicando que tanto la producción como la secreción de estas proteínas es correcta.

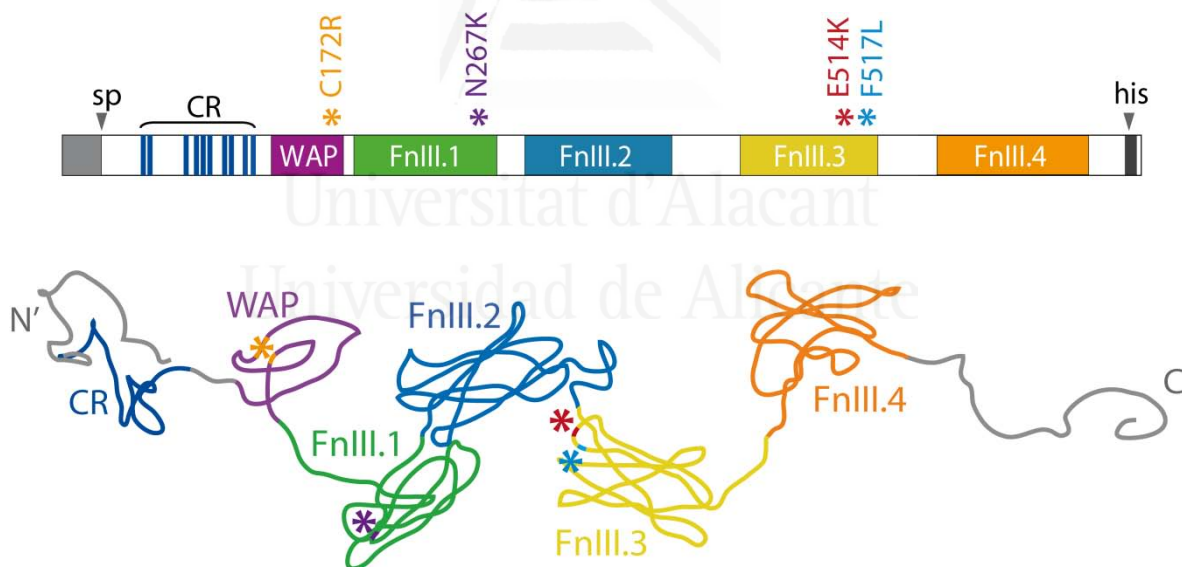
## 2. Efecto de anosmina-1 y sus mutantes en la migración de los neuroblastos de la SVZ, vía FGFR1

En publicaciones anteriores, nuestro grupo ha demostrado que anosmina-1 tiene un efecto quimioatrayente sobre los neuroblastos de la SVZ, vía FGFR1 (García-González et al. 2010). Tomando como modelo los neuroblastos de la SVZ, observamos que el efecto de anosmina-1 sobre estas células es suprimido por las sustituciones E514K o F517L. Este resultado sugiere que, además de impedir la unión del dominio FnIII.3 a FGFR1, la presencia de estas mutaciones puede provocar un cambio conformacional en la proteína suficiente como para desestabilizar la unión de los dominios de la región N-terminal de anosmina-1 al receptor FGFR1, dando lugar a una proteína no funcional. En ensayos de adhesión, el péptido 24III con la sustitución E514K incrementa la adhesión de dos tipos de líneas celulares en comparación con el control o con el mutante F517L (Robertson et al. 2001). Además, la proteína anosmina-1 mutada en cualquiera de estos dos residuos produce un fallo en la quimioatracción ejercida sobre las neuronas GnRH (Cariboni et al. 2004). Sin embargo, una forma de la proteína anosmina-1 truncada (A1Nt), sin los últimos tres dominios FnIII, sigue siendo quimioatrayente, vía FGFR1, para los neuroblastos de la SVZ. No así el dominio FnIII.3 por sí solo ya que, aunque interacciona con el receptor FGFR1 no es quimioatrayente para los neuroblastos.

Mientras la proteína anosmina-1 que contiene cualquiera de las dos mutaciones en la región N-terminal, C172R y N267K, no presenta un efecto biológico sobre los neuroblastos de la SVZ, estas sustituciones en A1Nt no suprimen dicho efecto. Efectos contradictorios han sido observados en presencia de diversas formas mutadas de anosmina-1. En *Drosophila*, la sobreexpresión de un mutante de anosmina-1 en el dominio WAP (C127/128S) o en FnIII.1 (S263K, equivalente a la mutación N267K descrita en humanos), da lugar a una malformación fenotípica similar a la que se produce cuando se sobreexpresa anosmina-1 (Andrenacci et al. 2006). En *C. elegans*, la sobreexpresión de anosmina-1, o de una forma mutada de esta proteína en el dominio WAP, produce un defecto en la ramificación axonal de las interneuronas sensoriales AIY, aunque este defecto no ocurre en presencia de la proteína que contiene la mutación S241K en FnIII.1. Sin embargo, en las neuronas sensoriales AFD, tanto anosmina-1 como la forma mutada en S241K producen una alteración en la guía axonal, pero no la forma mutada de esta proteína en el dominio WAP (Bülow et al. 2002).

La mutación C172R, presente tanto en la proteína anosmina-1 completa como en A1Nt, no aumenta el crecimiento de neuritas en las células FNC-B4 promovido por anosmina-1 (González-Martínez et al. 2004). Además, ambas proteínas cancelan el efecto proliferativo observado para anosmina-1 sobre las células PC-3, sugiriendo que un dominio WAP intacto es esencial, aunque *in vitro*, estas proteínas mutadas sean capaces de incrementar la capacidad proteolítica de la serín proteasa uPA (Hu et al. 2004).

La función de los diferentes dominios de anosmina-1 podría estar determinada o condicionada por el ambiente extracelular y el tipo celular, así como por la interacción con distintos receptores o moléculas (Andrenacci et al. 2006; Bülow et al. 2002). Las respuestas biológicas ejercidas por A1Nt con las mutaciones anteriormente citadas pueden ser diferentes de las respuestas producidas por la proteína completa mutada. La falta de los tres últimos dominios FnIII, junto con las mutaciones, podrían alterar la capacidad de unión a FGFR1, a otros receptores y/o a otras moléculas de la ECM. Todos estos datos indican que la mutación C172R, aunque no afecta a la unión con FGFR1, provoca que la proteína anosmina-1 no funcione adecuadamente, y que la mutación N267K, al menos en la forma completa de anosmina-1, da lugar a una proteína que no es capaz de unirse con FGFR1 (Hu et al. 2009) (**Figura 16**).



**Figura 16: Localización de las mutaciones descritas en pacientes con síndrome de Kallmann en la proteína anosmina-1.** Los asteriscos indican la posición de las sustituciones estudiadas: en naranja, sustitución C162R, localizada en el dominio WAP; en lila, sustitución N267K, en el primer dominio FnIII; en rojo y azul, sustituciones E514K y F517L respectivamente, en el lazo de unión entre las hebras F y G del dominio FnIII.3.



Ya que tanto A1Nt como el dominio FnIII.3 interaccionan con FGFR1, y las mutaciones E514K y F517L suprimen dicha interacción provocando la pérdida del efecto quimioatractivo de anosmina-1 (Cariboni et al. 2004), llevamos a cabo la sustitución del dominio FnIII.1 por el dominio FnIII.3 en A1Nt. Esta proteína recombinante todavía es capaz de unirse a FGFR1 pero no muestra un efecto biológico, por lo que aunque se una al receptor, no es capaz de activarlo. Esto podría deberse a que la proteína recombinante se une a FGFR1 a través de FnIII.3, anclando los dominios CR y WAP en un sitio diferente al que los conduce FnIII.1 y que, al unirse a una región incorrecta del receptor, se pierda su funcionalidad.

Como ya se ha mencionado, el dominio CR podría tener un papel regulador facilitando o evitando la interacción de los dominios FnIII con diferentes moléculas y, junto con el dominio WAP, podría ayudar a que el dominio FnIII.1 adquiera la conformación óptima para que anosmina-1 interaccione con FGFR1 (Andrenacci et al. 2006; Hu et al. 2009; Robertson et al. 2001). Experimentos anteriores realizados en *Drosophila*, muestran que la sustitución C85S en el dominio CR de anosmina-1 todavía presenta un efecto en el crecimiento axonal en comparación con el fenotipo control analizado (Andrenacci et al. 2006). Nuestros datos sugieren que el dominio CR no es necesario para la interacción de A1Nt con FGFR1, aunque la delección de este dominio anula el efecto quimioatractivo de la proteína vía FGFR1 sobre los neuroblastos de la SVZ, lo que sugiere que esta región desempeña una competencia distinta en la función de anosmina-1.

Además de las mutaciones mencionadas anteriormente, cerca de 60 mutaciones han sido identificadas en el gen *KAL1* asociadas con el KS, principalmente mutaciones de pérdida de función, como cambios en el marco de lectura, codones de parada o delecciones, algunas de las cuales dan lugar a proteínas truncadas o incompletas que serían suficientes para explicar su implicación en el KS (Hu y Bouloux 2011). En el presente trabajo hemos generado varias de estas proteínas truncadas, ninguna de las cuales fue capaz de inducir efecto alguno sobre los neuroblastos de la SVZ.

Se ha sugerido que, en la superficie celular, anosmina-1 podría sufrir un procesamiento proteolítico en las posiciones 345-350 (KKKRRK) dentro del dominio FnIII.2, dando lugar a un péptido difusible C-terminal de 45kDa y una proteína N-terminal truncada (Rugarli et al. 1996). Nuestros datos indican que tanto una proteína truncada ligeramente más pequeña (A1Y328X), como una más larga que incluye el segundo dominio FnIII (A1Q421X) no tienen actividad biológica, por lo que el procesamiento proteolítico daría lugar a una proteína no funcional y, probablemente, sería el resultado de una proteólisis no específica o una degradación que regularía la actividad de la proteína. El hecho de que la proteína A1Nt conserve la actividad biológica (Bülow et al. 2002; González-Martínez et al. 2004; Hu et al. 2004) podría deberse a que esta forma de anosmina-1 es más estable que proteínas truncadas más largas, como las producidas por las mutaciones estudiadas en este trabajo, tal y como se ha observado en los análisis

realizado en *Drosophila* (Andrenacci et al. 2006). Estos datos indican que la presencia de cualquier secuencia adicional detrás del dominio FnIII.1, a menos que se trate de la secuencia completa de la proteína, puede desestabilizar la proteína y causar un plegamiento incorrecto de la misma impidiendo la correcta unión de anosmina-1 a FGFR1 u otras moléculas. Algunas mutaciones en el gen *KAL1* pueden dar lugar a proteínas truncadas que mantienen la región N-terminal de anosmina-1 (A1Nt). Si A1Nt es completamente funcional, tal vez existan mutaciones en el gen *KAL1* que pasan inadvertidas ya que mantendrían aquellos efectos que dependan de la parte N-terminal.

### **3. Activación de la vía de señalización intracelular ERK MAPK en el efecto quimiotrópico de FGF2/anosmina-1**

El crecimiento de neuritas y la migración neuronal requieren la reorganización de los filamentos de F-actina del citoesqueleto y, de hecho, anosmina-1 induce la formación de filopodios y la reorganización del citoesqueleto en estas células tras la activación de la vía Cdc42-Rac1. Además, el crecimiento de neuritas inducido por anosmina-1 vía FGFR1 en la línea celular FNC-4B derivada de neuroblastos del epitelio olfativo humano, se produce a través de la activación de las vías ERK y p38 MAPK (González-Martínez et al. 2004).

La implicación de la activación ERK MAPK en la migración neuronal ha sido descrita anteriormente, ya que la neurotrofina BDNF vía TrkB promueve la migración de los neuroblastos de la SVZ de ratón a través de la activación de CREB, que requiere de la señalización tanto de PI3K como de ERK (Chiaramello et al. 2007). La migración de las neuronas corticales en ratón inducida por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), requiere de la activación de diferentes vías, entre ellas ERK (Segarra et al. 2006) y la migración de los neuroblastos humanos controlados por la vía EGFR/PKC es dependiente de la activación de ERK1/2 (Moors et al. 2007).

Nuestros datos muestran que el efecto quimioatrayente sobre los neuroblastos de la SVZ, mediado tanto por FGF2 como por anosmina-1, vía FGFR1, es bloqueado por el inhibidor U0126, específico de la vía de señalización intracelular ERK MAPK. Estos resultados indican que la activación de esta cascada de señalización es esencial para la migración de los neuroblastos tras la estimulación de FGFR1.

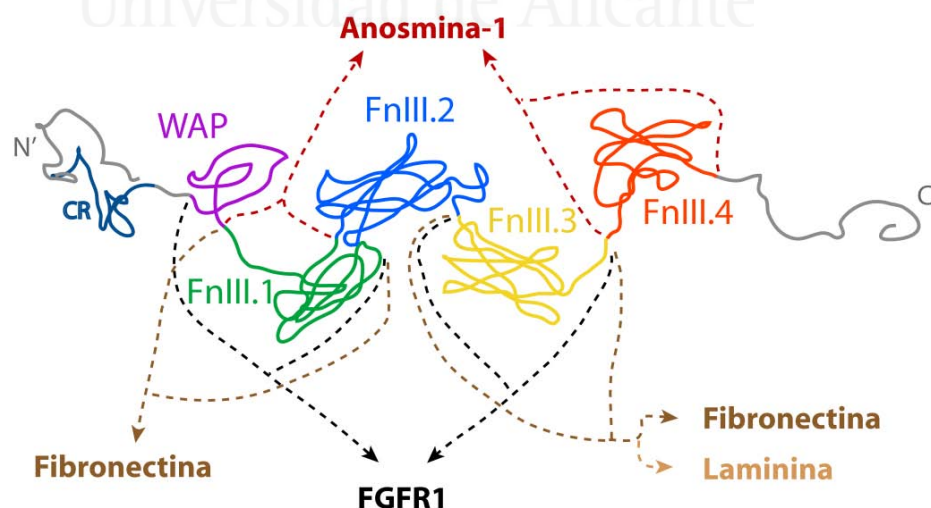
Otras vías implicadas en la migración neuronal y en el crecimiento de neuritas que regulan el citoesqueleto, la polaridad y/o la adhesión celular, como las GTPasas de la familia RHO (Govek et al. 2011) o la activación de Cdc42-Rac1 (González-Martínez et al. 2004) podrían ser clave en los efectos biológicos de anosmina-1 vía FGFR1, y por lo tanto deberían ser estudiadas en el futuro.

#### 4. Interacción entre anosmina-1 y diferentes moléculas de la ECM

La actividad de diferentes componentes de la ECM puede verse modulada por anosmina-1. Como ya se ha mencionado, esta proteína es capaz de interactuar con otras proteínas de la ECM, como fibronectina y laminina, afectando a la adhesión de los OPCs en ratón (Bribián et al. 2008) y se ha descrito una interacción directa entre la proteína de la ECM uPA y anosmina-1 (Hu et al. 2004).

Nosotros hemos determinado qué regiones de anosmina-1 son las que participan en la interacción con estas moléculas. Mientras que la interacción con fibronectina se produce tanto con los dominios FnIII.1 y FnIII.3 de anosmina-1, la interacción con laminina sucede sólo con el dominio FnIII.3. Al contrario que en el caso de FGFR1, en la interacción del dominio FnIII.3 de anosmina-1 con fibronectina y laminina, participan ambas hebras, tanto ABE como GFCC' (**Figura 15 y 17**). Igualmente, la existencia de interacciones homofílicas anosmina-1/anosmina-1 había sido descrita (Bribián et al. 2008), así como la dimerización de esta proteína, al menos a través de la región N-terminal (Hu et al. 2009). Nuestros datos confirman la interacción directa anosmina-1/anosmina-1 a través de los dominios FnIII.1 y FnIII.4.

La interacción anosmina-1/anosmina-1 podría indicar un mecanismo independiente a FGFR1, ya que en ella están implicados otros dominios diferentes a los que participan en la unión con FGFR1 (**Figura 17**). No podemos descartar que dentro del dominio FnIII.1 sean los mismos residuos los que puedan participar en la unión anosmina-1/FGFR1 o anosmina-1/anosmina-1. En este sentido, resultados previos también apuntan a un mecanismo de acción de anosmina-1 independiente de FGFR1, tanto en la proliferación de las células PC-3 (Hu et al. 2004), como en la adhesión de los OPCs a fibronectina, laminina y anosmina-1 cuando actúan como sustrato (Bribián et al. 2008).

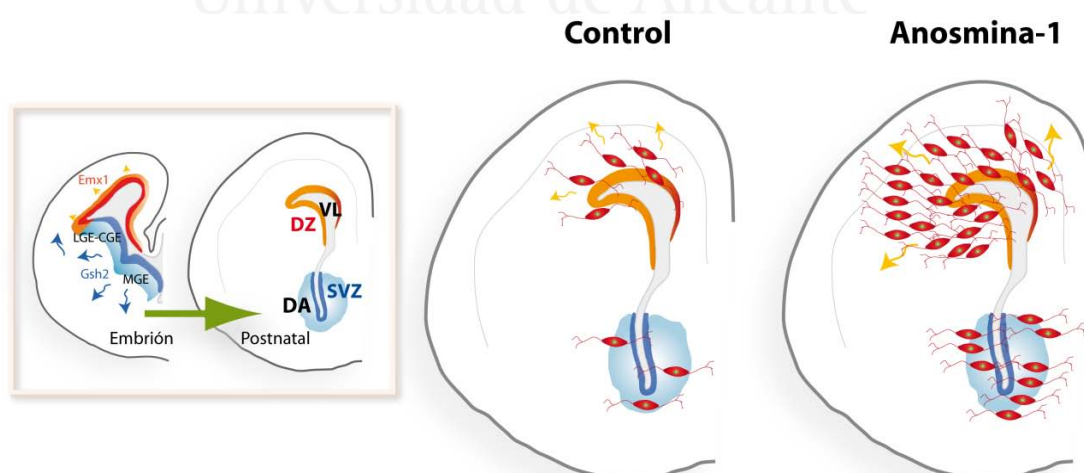


**Figura 17: Mapa de interacciones de anosmina-1.** Anosmina-1 interactúa con el receptor FGFR1 a través de sus dominios WAP-FnIII.1 y el dominio FnIII.3. En la interacción de anosmina-1 con fibronectina están implicados los dominios FnIII.1 y FnIII.3, pero sólo el dominio FnIII.3 participa en la interacción con laminina. La interacción homofílica anosmina-1/anosmina-1 tiene lugar a través de los dominios FnIII.1 y FnIII.4.

La interacción de fibronectina y laminina con la proteína anosmina-1 no se ve afectada por la introducción en esta última de las dos mutaciones descritas anteriormente en el dominio FnIII.3, E514K y F517L. Sólo la interacción con fibronectina parece estar afectada, parcialmente, cuando se introduce la mutación F517L reduciendo, pero en ningún caso impidiendo, la unión entre ambas proteínas. Esto podría indicar, de nuevo, un mecanismo independiente de FGFR1, reforzando la idea de la especificidad de las mutaciones E514K y F517L en la unión al receptor FGFR1.

### 5. Anosmina-1 promueve la proliferación y migración de los OPCs que se originan en la SVZ

En algunos pacientes con KS han sido descritas alteraciones en las comisuras cerebrales y en tractos mielinizados (Farmer et al. 2004) y se han detectado células gliales anosmina-1<sup>+</sup>, con una morfología oligodendroglial, en el cuerpo calloso y tracto piramidal del cerebelo en rata (Clemente et al. 2008). Los OPCs que se originan en el neuroepitelio de la región ventricular durante el estado embrionario temprano y en la SVZ, migran de manera radial y/o tangencial colonizando el telencéfalo, donde se diferencian para comenzar la mielinización (Kessaris et al. 2006). La caracterización de una línea de ratón transgénico que sobreexpresa la proteína A1 humana mostró un incremento en el número de OPCs que se originan en la SVZ, una de las principales zonas de oligodendrogénesis, así como en uno de los tractos mielinizados más destacados, el cuerpo calloso. El incremento en el número de OPCs es debido a un aumento de proliferación observada en la región dorsal de la zona ventricular, en la zona subventricular y alrededor de la SVZ (a la que hemos denominado como "zona de dispersión") a E16.5 y P0, edad correspondiente al periodo más activo de oligodendrogénesis (Kessaris et al. 2006) (Figura 18).



**Figura 18: Efecto de la sobreexpresión de anosmina-1 en la oligodendrogénesis.** La SVZ, una de las regiones más importantes de oligodendrogénesis, presenta un incremento significativo en el número de OPCs en los ratones transgénicos que sobreexpresan anosmina-1, debido a un aumento en la proliferación de estas células. SVZ: zona subventricular; DZ: zona ventricular dorsal; DA: zona de dispersión; VL: ventrículo lateral.

De la misma manera que anosmina-1 aumentó el número de OPCs, otros factores promueven la oligodendrogénesis. Algunos factores de crecimiento como FGF-2, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AA) incrementan la proliferación de los OPCs (Bansal et al. 2003; Hu et al. 2008; Ohya et al. 2007), y la sobreexpresión de EGFR aumenta la proliferación y migración de los OPCs, así como la expresión de la proteína de mielina MBP ("*myelin basic protein*") (Aguirre y Gallo 2007; Aguirre et al. 2007). La sobreexpresión del factor de transcripción Olig2 también aumenta en el número de OPCs que se diferencian en OLs, adelantando el proceso de mielinización (Maire et al. 2010).

La relación funcional entre anosmina-1 y el sistema FGF2/FGFR1 ha sido descrita en numerosas ocasiones (Ayari y Soussi-Yanicostas 2007; González-Martínez et al. 2004; Hu et al. 2009). Se ha descrito que anosmina-1 participa, por un lado, en la migración de los OPCs *in vitro* modulando el efecto motogénico de FGF2 sobre estas células mediado por FGFR1 (Bribián et al. 2006; Clemente et al. 2011), y por otro, en la adhesión a diferentes sustratos de la ECM que contribuyen a su migración por un mecanismo independiente de FGFR1 (Bribián et al. 2008).

Nuestros datos *in vitro* muestran que los OPCs derivados de purificados de cortezas cerebrales de ratones transgénicos A1 postnatales tienen una capacidad de migración mayor en comparación con OPCs purificados de ratones controles. Estos datos están en consonancia con los estudios realizados previamente, donde el bloqueo de la anosmina-1 endógena expresada por los OPCs del nervio óptico dificulta su migración (Bribián et al. 2008). La sobreexpresión de anosmina-1, vía FGFR1, puede ser la responsable del aumento en la capacidad migradora de estas células contribuyendo al incremento del número de OPCs en el área de dispersión que rodea a la SVZ. Sin embargo, se ha descrito en OPCs del nervio óptico de ratón, que anosmina-1 antagoniza el efecto premigratorio de FGF2 vía FGFR1 (Bribián et al. 2006). Este efecto puede deberse a que una concentración elevada de la proteína anosmina-1 impide la correcta formación del complejo FGF2-FGFR1-HS, y por lo tanto no se produciría la cascada de señalización intracelular desencadenada por la unión FGF2-FGFR1-HS (Hu et al. 2009).

El tratamiento de los OPCs de los ratones A1 con el bloqueante de FGFRs, SU5402, no suprime a niveles control su elevada capacidad de migración, por lo que otro mecanismo independiente de FGFR1 puede estar interviniendo en este proceso. La interacción de anosmina-1 con moléculas de la ECM (fibronectina, laminina y con la propia anosmina-1) y/o quizá otros receptores, puede contribuir con un mecanismo independiente de FGFR1 incrementando la capacidad migratoria de los OPCs (Bribián et al. 2008).

## 6. La sobreexpresión de anosmina-1 aumenta el número de OLs maduros incrementando la mielinización de los axones del cuerpo caloso

Los OPCs se diferencian en OLs y mielinizan los axones de las neuronas una vez han alcanzado su área de destino (Butts et al. 2008; Hack et al. 2005; Kessarar et al. 2006; Menn et al. 2006). El análisis mediante *In-Cell Western* mostró que en medio de diferenciación, tras 2 o 5 días *in vitro* (DIV), los OPCs purificados de las cortezas cerebrales de ratones transgénicos A1 postnatales expresaban aproximadamente el doble de proteína MBP que los OPCs de ratones control. Cuando estas células fueron cultivadas sobre cubreobjetos, a los 2 y 5 DIV, el número de células que presentaron características morfológicas de OLs maduros (con más procesos y expresando MBP como marcador de la diferenciación hacia un fenotipo de OL formador de mielina) fue mayor en los OPCs purificados a partir de los animales A1.

En concordancia con estos hallazgos *in vitro*, la cuantificación de los OLs en el cuerpo caloso de los animales transgénicos A1 a P30 *in vivo*, también reveló un aumento en el número de OPCs y de OLs maduros en comparación con los animales control, lo que sugiere que el incremento de OPCs que se detectó en estadios tempranos del desarrollo de los ratones transgénicos, se traduce en un aumento de OLs en el adulto. Aunque el número de OLs mielinizantes que sobreviven se ajusta al número y la longitud de los axones que van a ser mielinizados (Barres y Raff 1999), la cuantificación de la muerte celular de estas células mediante TUNEL a P15 y P30 no mostró diferencias entre los genotipos estudiados en respuesta a la sobreexpresión de anosmina-1, por tanto los OLs en el ratón transgénico se incorporan adecuadamente para mielinizar los axones.

El aumento en el número de OLs provoca un incremento en la expresión de la proteína MBP en los ratones transgénicos en comparación con los animales control, durante el periodo más activo de la mielinización, que ocurre en torno a P15 (Flores et al. 2008; Lu et al. 2005) y continúa a P30 y P90, cuando el proceso de mielinización ya ha finalizado.

La señalización a través de los receptores FGFRs regula el proceso de mielinización, ya que la activación de FGFR1 en la diferenciación de los OLs se asocia con un aumento en la expresión de los genes de mielina (Fortin et al. 2005). Dada la interacción tanto física como funcional entre anosmina-1 y FGFR1, la sobreexpresión de anosmina-1 podría activar la señalización a través de FGFR1 en las células oligodendrogiales, dando lugar a un incremento en la mielinización. Los OLs necesitan la activación de la vía de señalización intracelular ERK1/2-MAPK, a través de FGFRs, para el correcto ensamblaje de las envueltas de mielina alrededor de los axones (Furusho et al. 2011; Furusho et al. 2012). Es posible que los OLs repondan a FGFs en sinergia con otras señales mielinogénicas, y anosmina-1 actuaría como otras moléculas de adhesión (CAMs) o las integrinas (N-caderina, NCAM y L1), que son capaces de activar los receptores FGFRs en los OLs (Palser et al. 2009; Rusnati et al. 1997; Toledo et al. 2005).



El análisis ultraestructural de los axones del cuerpo caloso a P30 y P90 reveló un aumento en el grosor de la vaina de mielina tras la cuantificación de la g-ratio de las fibras mielínicas en los animales transgénicos que sobreexpresan anosmina-1, sin alterar por ello ni el diámetro del axón ni el porcentaje de axones mielinizados. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de la proteína anosmina-1 humana, bajo el promotor de la  $\beta$ -actina y que, por lo tanto, es expresada por todas las células del SNC, presenta un efecto en la proliferación y en la migración de las células del linaje oligodendroglial. El incremento en la proliferación de los OPCs durante el desarrollo, conlleva un aumento en el número de OLs maduros que se traduce, a su vez, en una hipermielinización de los axones del cuerpo caloso.

Varios modelos de ratón transgénico han sido utilizados para estudiar el efecto de pérdida o ganancia de función de diferentes proteínas en la oligodendrogénesis o en mielinización. La sobreexpresión de IGF-1 induce un incremento en la cantidad de mielina producida por OL, sin incrementar el número total de OLs (Carson et al. 1993) y un fenotipo similar se observa en un ratón que sobreexpresa, bajo el promotor *Plp*, una forma constitutivamente activa de Akt, sin alterar el número de OPCs, su proliferación o el número de OLs maduros, pero incrementando los niveles de proteínas PLP, MOG y MBP (Flores et al. 2008). También, la sobreexpresión de transferrina promueve la aceleración de la maduración de la línea oligodendroglial, incrementando la expresión de ARNm de los genes que codifican para las diferentes proteínas que conforman la mielina, dando como resultado un aumento en la mielinización del cuerpo caloso (Sow et al. 2006). Por el contrario, la sobreexpresión de anosmina-1 incrementa tanto el número de OPCs como el de OLs, así como la cantidad global de mielina en el cerebro. Efectos durante el desarrollo tanto en la producción de OPCs, como en la diferenciación de los OLs han sido publicados en el ratón deficiente para el inhibidor de CDK2 *p27<sup>-/-</sup>*, donde el fallo de los OPCs para salir del ciclo celular conduce a un incremento en el número de OPCs, OLs y a una hipermielinización del cerebelo (Casaccia-Bonnel et al. 1997). El doble mutante *fgfr1<sup>-/-</sup>;fgfr2<sup>-/-</sup>* es incapaz de mielinizar correctamente los axones y además muestra una baja expresión de los genes de mielina, sin afectar a la proliferación y/o diferenciación de los OPCs (Furusho et al. 2012). Aunque en el doble mutante knockout *erk1<sup>-/-</sup>;erk2<sup>-/-</sup>* los OPCs proliferan y se diferencian adecuadamente a lo largo del desarrollo, son incapaces de mielinizar correctamente en función del calibre del axón y, además, no activan la transcripción de algunos genes implicados en el proceso de mielinización (Ishii et al. 2012). Estos trabajos apoyan el hecho de que la sobreexpresión de anosmina-1 active la señalización intracelular, a través del receptor FGFR1, relevante para el desarrollo oligodendroglial, aumentando el número de OPCs y OLs, y el proceso de mielinización posterior (**Tabla 3**).

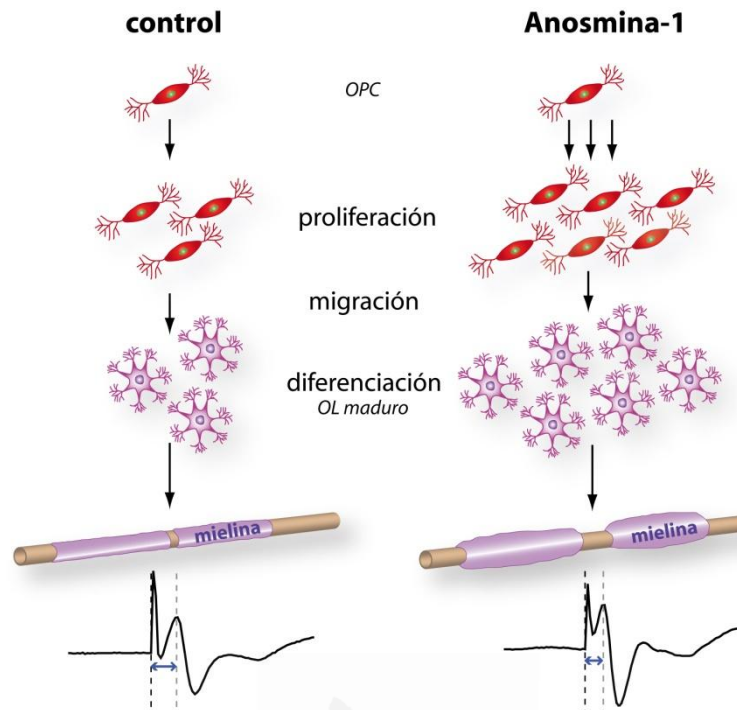
Fenotipo Genotipo	OPCs	OLs	Mielina	Velocidad de conducción	Referencia
↑ IGF-1	-	normal	↑	¿?	Carson et al. 1993
↑ Akt	normal	normal	↑	¿?	Flores et al. 2008
↑ Olig2	↑	-	∪	¿?	Maire et al. 2010
↑ Transferrina	-	↑	∪	¿?	Sow et al. 2006
CDK2 p27 <sup>-/-</sup>	↑	↑	↑	¿?	Casaccia-Bonnet et al. 1997
fgfr1 <sup>-/-</sup> ;fgfr2 <sup>-/-</sup>	normal	normal	↓	¿?	Furusho et al. 2012
erk1 <sup>-/-</sup> ;erk2 <sup>-/-</sup>	normal	normal	↓	¿?	Ishii et al. 2012
OMgp <sup>-/-</sup>	-	↓	↓	↓	Lee et al. 2011
↑ Plp1 <sup>tg/-</sup>	-	-	↓	↓	Tanaka et al. 2009
↑ A1	↑	↑	↑	↑	Resultados Capítulo 2
↑ PMP22	-	-	↓	↓ (SNP)	Robaglia-Schlupp et al. 2011
ngr1 <sup>+/-</sup> ;erb2 <sup>+/-</sup>	-	-	↓	↓ (SNP)	Michailov et al. 2004

**Tabla 3: Modelos de ratones transgénicos en los que ganancia o pérdida de función de determinadas proteínas presentan diferentes efectos en el proceso de mielinización.** El incremento de la mielinización no siempre es debido a un aumento del número de OPCs y/o OLs. La activación o inhibición de la transcripción de los genes de las proteínas que componen la mielina también regulan la mielinización del sistema nervioso. Como consecuencia, la transmisión del impulso nervioso se altera, tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP). ↑: sobreexpresión de la proteína correspondiente; -/-: ausencia del gen que codifica la proteína indicada; +/-: heterocigoto para la proteína señalada; ∪: aceleración del proceso de mielinización; ↑: incremento del número de OPCs, OLs o de la cantidad de mielina, según corresponda.

Varios factores determinan la velocidad de conducción del impulso nervioso, entre ellos, el diámetro del axón, el grosor de la mielina, la distancia internodal, las propiedades del nodo de Ranvier (como el tamaño del nodo o la composición de su membrana) y la temperatura (Bekku et al. 2010; Waxman 1980; Waxman 1997). La velocidad de conducción está correlacionada linealmente con el diámetro del axón ya que, para un diámetro determinado, hay un grosor de mielina que maximiza la transmisión del impulso nervioso y, si el grosor de mielina fuera mayor o menor que este grosor ideal, la velocidad de conducción no alcanzaría este máximo (Rushton 1951; Waxman 1997).

Una cantidad anormal de MBP contribuye, en muchos casos, a una estructura alterada de la mielina (Flores et al. 2008; Jacobs et al. 2009), y el fallo en la regulación de la expresión de los genes de mielina causa alteraciones en los OLs, así como modificaciones en las capas de mielina que pueden favorecer o impedir que la transmisión del impulso nervioso se produzca correctamente (Tanaka et al. 2009; Yamazaki et al. 2007). La sobreexpresión de anosmina-1 indujo, además de un aumento en el grosor de la vaina de mielina, un incremento en la longitud de los nodos de Ranvier sin variar el número de nodos. Ambas alteraciones en el proceso normal de mielinización en estos animales transgénicos se asocian con un aumento en la velocidad de conducción del impulso nervioso a lo largo del cuerpo calloso (Figura 19).





**Figura 19: Efectos de la sobreexpresión de anosmina-1 sobre la proliferación, migración y diferenciación de las células oligodendrogiales.** En los ratones control, la tasa de proliferación y migración da lugar tanto a una cantidad normal de proteína MBP como a un correcto proceso de mielinización. Sin embargo, la sobreexpresión de anosmina-1 incrementa el número de OPCs que proliferan y migran, dando lugar a un aumento de OLs. El resultado es una hipermielinización de los axones del cuerpo calloso por el aumento de la cantidad de proteína MBP y una longitud anómala en el nodo de Ranvier. La hipermielinización provoca un incremento en la velocidad de conducción del impulso nervioso en el cuerpo calloso en estos animales transgénicos.

En este sentido, tanto la sobreexpresión de la proteína periférica de mielina PMP22 como la falta de la proteína OMgp, dan lugar a una hipomielinización y una disminución de la velocidad de conducción en el SNP y en el SNC (Lee et al. 2011; Robaglia-Schlupp et al. 2002). La sobreexpresión de neuroregulina-1 *in vivo* produce una hipermielinización en el SNP, pero los animales heterocigotos para *nrg1<sup>+/-</sup>;erb2<sup>+/-</sup>* muestran hipomielinización y una velocidad de conducción más lenta en el SNP (Michailov et al. 2004).

En nuestro caso, la hipermielinización de los axones en los ratones que sobreexpresan anosmina-1 favoreció la transmisión del impulso nervioso. Es probable que a un mayor grado de mielinización, el impulso nervioso llegue a una velocidad de conducción máxima, a partir de la cual sería difícil detectar un incremento de la velocidad de conducción.

Las interacciones entre las células gliales y el axón son esenciales para la localización de los canales iónicos en el nodo de Ranvier, y las proteínas de la ECM ayudan a la formación del complejo axoglial, facilitando la inducción y propagación de los potenciales de acción (Bekku et al. 2010; Poliak y Peles 2003). Anosmina-1 es una proteína de la ECM y, aunque no se observan diferencias en el número de nodos de Ranvier, el incremento de

su longitud en los animales transgénicos sugiere que la interacción neurona-oligodendrocito puede estar alterada, debido a un desequilibrio en las moléculas de la ECM causado por la sobreexpresión de anosmina-1. Estas alteraciones estructurales y electrofisiológicas pueden dar lugar a defectos en el comportamiento y aprendizaje (Tanaka et al. 2009; Yamazaki et al. 2007) que deberán ser investigados en animales adultos.

## 7. Anosmina-1: posibles implicaciones patogénicas y terapéuticas en el SNC

Al igual que otras células precursoras del SNC, los OPCs son altamente sensibles a los estímulos de su entorno. Tras una lesión que provoque la desmielinización de una región del SNC, los OPCs se dividen rápidamente y se diferencian en OLs capaces de mielinizar (Franklin 2002). Entre los factores que son capaces de promover la diferenciación de los OPCs *in vitro* (Baer et al. 2009; Colognato et al. 2004; McCarthy y de Vellis 1980) podemos encontrar desde aquellos que forman parte de la ECM, como las integrinas (Blaschuk et al. 2000; Buttery y French-Constant 1999; Relvas et al. 2001), hasta algunos neurotransmisores que actúan sobre los receptores de glutamato y los  $\beta$ -adrenoreceptores (Ghiani et al. 1999; Steinhäuser y Gallo 1996), o factores de crecimiento y citoquinas, entre otros (O'Leary et al. 2002; Woodruff et al. 2004). Los receptores del ácido retinoico (RXRs) son reguladores positivos de la proliferación y diferenciación de los OPCs. En las lesiones agudas y remielinizadas en pacientes con EM, los RXR $\gamma$  son altamente expresados en las células oligodendrogiales, macrófagos y astrocitos, pero su expresión disminuye en las lesiones crónico-inactivas, donde los OPCs que llegan a esta zona son incapaces de diferenciarse a OLs maduros formadores de mielina (Chang et al. 2000; Kuhlmann et al. 2008; Wolswijk 1998). El análisis de un ratón knockout para RXR $\gamma$ , al que se le provoca una desmielinización en el SNC, presenta una acumulación de OPCs indiferenciados y una disminución de los OLs maduros en la lesión, indicando que RXR $\gamma$  regula la diferenciación de los OPCs (Huang et al. 2011).

Además de factores que promueven la diferenciación de los OPCs, también existen factores que la inhiben y, algunos de ellos, han sido identificados en las lesiones crónicas de los pacientes con EM. Entre estos factores se encuentra la molécula de adhesión PSA-NCAM, que regula negativamente la formación de la vaina de mielina (Charles et al. 2000) y el ácido hialurónico producido por los astrocitos que disminuye la expresión de la proteína MBP (Back et al. 2005). La molécula sema3A tiene un impacto negativo en la remielinización del SNC (Williams et al. 2007), ya que ejerce un efecto repulsivo en la migración de los OPCs, aunque parece ser contrarrestado por la expresión de sema3F que actúa como un factor quimioatrayente y mitogénico para los OPCs (Spassky et al. 2002).

La señalización intracelular desencadenada por diversas moléculas también regula la diferenciación de los OLs. La señalización a través del receptor Notch, dependiendo del tipo de ligando, puede inhibir o promover la diferenciación y maduración de los OPCs (Brosnan y John 2009). Notch1 inhibe la diferenciación de los OPCs y la mielinización

durante el desarrollo del SNC (Wang et al. 1998) y, en una línea de ratón knockout, su inactivación específica en las células oligodendrogliales, da lugar a una mielinización acelerada y ectópica (Genoud et al. 2002; Givogri et al. 2002). La señalización de Wnt inhibe la diferenciación de los OPCs durante el desarrollo y en la remielinización (Fancy et al. 2009) y, concretamente, la señalización de Wnt3a y BMP4 inhibe la diferenciación de los OLS *in vitro* (Fancy et al. 2011; Feigenson et al. 2011). Recientemente, se ha descrito que anosmina-1 se une a WNT3a e inhibe su actividad (Endo et al. 2012), por lo que podría intervenir a través de esta vía favoreciendo la diferenciación de los OPCs. También, el factor de crecimiento FGF8 se une a anosmina-1 pero, en este caso, aumentando su actividad, al igual que con FGF2 y FGF4 (Endo et al. 2012). Se ha descrito que anosmina-1 y FGF2 se encuentran expresados selectivamente en las distintas lesiones de EM en pacientes humanos y que ambas moléculas podrían tener un papel importante en la migración de OLS durante esta patología aunque, en este caso, en sentido contrario a nuestras observaciones, probablemente debido al ambiente inflamatorio que subyace en las lesiones de EM (Clemente et al. 2011).

La señalización a través de los receptores FGFRs regula el proceso de mielinización a través de la diferenciación de los OLS, que se asocia con un aumento en la expresión de los genes de mielina y en la mielinización de los axones del SNC (Fortin et al. 2005; Furusho et al. 2011; Furusho et al. 2012). Nosotros hemos identificado a la proteína anosmina-1 como un importante modulador de la progresión de la línea oligodendroglial, así como su efecto en el control de la expresión de MBP y la formación de la mielina, con consecuencias electrofisiológicas. A través de la interacción con FGFR1, la proteína anosmina-1, podría activar la cascada de señalización intracelular que conduce a la expresión de los genes de mielina.

El papel de anosmina-1 en el desarrollo de los OPCs y de la estructura de la mielina tiene importantes implicaciones en el proceso de mielinización y remielinización en el SNC de adulto. Estos nuevos hallazgos sobre los efectos biológicos de la proteína anosmina-1, permiten encaminar la dirección de nuestra investigación hacia nuevas estrategias en terapias de remielinización en las enfermedades desmielinizantes, como la EM, u otros desórdenes neurológicos como la esquizofrenia (Corfas et al. 2004; Tanaka et al. 2009) y/o encontrar una explicación a los síntomas satélites identificados en pacientes con KS, supuestamente asociados con alteraciones en tractos mielinizados, como las sinquinesias y los movimientos anómalos de los ojos (Conrad et al. 1978; Schwankhaus et al. 1989)



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **CONCLUSIONES**



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

1. El dominio FnIII.3 de anosmina-1 interacciona con FGFR1 y las mutaciones E514K y F517L en este dominio impiden esta unión.
2. La combinación de los dominios WAP-FnIII.1 de anosmina-1 es necesaria para la interacción de esta proteína con FGFR1, mientras que la región CR no lo es, aunque podría regular esta interacción.
3. La mutación C172R en el dominio WAP de anosmina-1, no altera la capacidad de unión a FGFR1, mientras que la mutación N267K en el dominio FnIII.1, impide casi por completo esta interacción.
4. Tanto anosmina-1 como la forma truncada A1Nt, que incluye los dominios CR, WAP y FnIII.1, son quimioatrayentes para los neuroblastos de la SVZ. Este efecto es anulado por las mutaciones E514K y F517L en el dominio FnIII.3, así como con las mutaciones C172R en el dominio WAP o N267K en FnIII.1 en la proteína completa y no en A1Nt.
5. Algunas de las mutaciones descritas en pacientes con KS en la proteína anosmina-1, dan lugar a proteínas truncadas que anulan la capacidad quimiotrópica de anosmina-1 sobre los neuroblastos de la SVZ.
6. La activación de FGFR1 mediante FGF2 o anosmina-1 activa la vía de señalización intracelular ERK1/2, necesaria para la migración de los neuroblastos de la SVZ.
7. La proteína anosmina-1 es capaz de unirse *in vitro*, mediante determinados dominios, a otras moléculas de la ECM como fibronectina y laminina, además de interactuar consigo misma, lo que confirma la importancia de las interacciones homofílicas anosmina-1/anosmina-1.
8. La sobreexpresión de anosmina-1 aumenta el número de OPCs tanto en la SVZ como en el cuerpo calloso durante el desarrollo, debido al incremento de la proliferación de estas células en el estado embrionario, que se traduce en más OLS en el cuerpo calloso de los ratones adultos.
9. Anosmina-1 incrementa la capacidad migratoria de los OPCs y favorece su diferenciación hacia un fenotipo de OL maduro formador de mielina *in vitro*.
10. La sobreexpresión de anosmina-1 aumenta el nivel de expresión MBP y el grosor de la vaina de mielina *in vivo*. Además, la longitud de los nodos de Ranvier es mayor en los animales transgénicos y la latencia de la velocidad de conducción del impulso nervioso a lo largo del cuerpo calloso disminuye.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## ***BIBLIOGRAFÍA***





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

- Aguirre A, Dupree JL, Mangin JM, Gallo V. 2007. A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat Neurosci.* 10:990-1002.
- Aguirre A, Gallo V. 2007. Reduced EGFR signaling in progenitor cells of the adult subventricular zone attenuates oligodendrogenesis after demyelination. *Neuron Glia Biol.* 3:209-220.
- Albuisson J, Pecheux C, Carel JC, Lacombe D, Leheup B, Lapuzina P, Bouchard P, Legius E, Matthijs G, Wasniewska M, Delpech M, Young J, Hardelin JP, Dodé C. 2005. Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2). *Hum Mutat.* 25:98-99.
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 137:433-457.
- Álvarez-Buylla A, Herrera DG, Wichterle H. 2000. The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. *Prog Brain Res.* 127:1-11.
- Andrenacci D, Grimaldi MR, Panetta V, Riano E, Rugarli EI, Graziani F. 2006. Functional dissection of the *Drosophila* Kallmann's syndrome protein DmKal-1. *BMC Genet.* 7:47.
- Arduin O, Legouis R, Fasano L, David-Watine B, Korn H, Hardelin J, Petit C. 2000. Characterization of the two zebrafish orthologues of the KAL-1 gene underlying X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Mech Dev.* 90:89-94.
- Arikawa E, Quellhorst G, Han Y, Pan H, Yang J. 2011. RT2 profiler™ PCR Arrays: Pathway-focused gene expression profiling with qRT-PCR. Technical article, SuperArray Bioscience Corporation.
- Armstrong RC, Harvath L, Dubois-Dalcq ME. 1990. Type 1 astrocytes and oligodendrocyte-type 2 astrocyte glial progenitors migrate toward distinct molecules. *J Neurosci Res.* 27:400-407.
- Arnold DL. 1999. Magnetic resonance spectroscopy: imaging axonal damage in MS. *J Neuroimmunol.* 98:2-6.
- Ayari B, Landoulsi A, Soussi-Yanicostas N. 2012. Localization and characterization of kal 1.a and kal 1.b in the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Bull.* 88:345-353.
- Ayari B, Soussi-Yanicostas N. 2007. FGFR1 and anosmin-1 underlying genetically distinct forms of Kallmann syndrome are co-expressed and interact in olfactory bulbs. *Dev Genes Evol.* 217:169-175.
- Back SA, Tuohy TM, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, Luo NL, Banine F, Liu Y, Chang A, Trapp BD, Bebo BF, Jr., Rao MS, Sherman LS. 2005. Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med.* 11:966-972.
- Baer AS, Syed YA, Kang SU, Mitteregger D, Vig R, French-Constant C, Franklin RJ, Altmann F, Lubec G, Kotter MR. 2009. Myelin-mediated inhibition of oligodendrocyte precursor differentiation can be overcome by pharmacological modulation of Fyn-RhoA and protein kinase C signalling. *Brain.* 132:465-481.
- Bansal R, Kumar M, Murray K, Morrison RS, Pfeiffer SE. 1996. Regulation of FGF receptors in the oligodendrocyte lineage. *Mol Cell Neurosci.* 7:263-275.
- Bansal R, Magge S, Winkler S. 2003. Specific inhibitor of FGF receptor signaling: FGF-2-mediated effects on proliferation, differentiation, and MAPK activation are inhibited by PD173074 in oligodendrocyte-lineage cells. *J Neurosci Res.* 74:486-493.
- Bansal R, Pfeiffer SE. 1992. Novel stage in the oligodendrocyte lineage defined by reactivity of progenitors with R-mAb prior to O1 anti-galactocerebroside. *J Neurosci Res.* 32:309-316.
- Bansal R, Pfeiffer SE. 1997. Regulation of oligodendrocyte differentiation by fibroblast growth factors. *Adv Exp Med Biol.* 429:69-77.
- Baron W, Hoekstra D. 2010. On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity. *FEBS Lett.* 584:1760-1770.
- Baron W, Metz B, Bansal R, Hoekstra D, de Vries H. 2000. PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Mol Cell Neurosci.* 15:314-329.
- Barres BA, Barde Y. 2000. Neuronal and glial cell biology. *Curr Opin Neurobiol.* 10:642-648.
- Barres BA, Raff MC. 1999. Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol.* 147:1123-1128.

- Bekku Y, Vargova L, Goto Y, Vorisek I, Dmytrenko L, Narasaki M, Ohtsuka A, Fassler R, Ninomiya Y, Sykova E, Oohashi T. 2010. Bral1: its role in diffusion barrier formation and conduction velocity in the CNS. *J Neurosci.* 30:3113-3123.
- Bergman JE, de Ronde W, Jongmans MC, Wolffenbuttel BH, Drop SL, Hermus A, Bocca G, Hoefsloot LH, van Ravenswaaij-Arts CM. 2012. The results of CHD7 analysis in clinically well-characterized patients with Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 97:E858-E862.
- Bianco SD, Kaiser UB. 2009. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol.* 5:569-576.
- Blaschuk KL, Frost EE, French-Constant C. 2000. The regulation of proliferation and differentiation in oligodendrocyte progenitor cells by alphaV integrins. *Development.* 127:1961-1969.
- Bottcher RT, Pollet N, Delius H, Niehrs C. 2004. The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling. *Nat Cell Biol.* 6:38-44.
- Bribián A, Barallobre MJ, Soussi-Yanicostas N, de Castro F. 2006. Anosmin-1 modulates the FGF-2-dependent migration of oligodendrocyte precursors in the developing optic nerve. *Mol Cell Neurosci.* 33:2-14.
- Bribián A, Esteban PF, Clemente D, Soussi-Yanicostas N, Thomas JL, Zalc B, de Castro F. 2008. A novel role for anosmin-1 in the adhesion and migration of oligodendrocyte precursors. *Dev Neurobiol.* 68:1503-1516.
- Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Muller T, Wende H, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyushkin K, Goebbels S, Fischer TM, Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH, Nave KA. 2008. Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron.* 59:581-595.
- Brosnan CF, John GR. 2009. Revisiting Notch in remyelination of multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest.* 119:10-13.
- Brümmendorf T, Rathjen FG. 1993. Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem.* 61:1207-1219.
- Bülow HE, Berry KL, Topper LH, Peles E, Hobert O. 2002. Heparan sulfate proteoglycan-dependent induction of axon branching and axon misrouting by the Kallmann syndrome gene kal-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:6346-6351.
- Bülow HE, Hobert O. 2004. Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development. *Neuron.* 41:723-736.
- Buttery PC, French-Constant C. 1999. Laminin-2/integrin interactions enhance myelin membrane formation by oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 14:199-212.
- Butts BD, Houde C, Mehmet H. 2008. Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: implications for normal development and disease. *Cell Death Differ.* 15:1178-1186.
- Cariboni A, Davidson K, Rakic S, Maggi R, Parnavelas JG, Ruhrberg C. 2011. Defective gonadotropin-releasing hormone neuron migration in mice lacking SEMA3A signalling through NRP1 and NRP2: implications for the aetiology of hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Mol Genet.* 20:336-344.
- Cariboni A, Hickok J, Rakic S, Andrews W, Maggi R, Tischkau S, Parnavelas JG. 2007. Neuropilins and their ligands are important in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci.* 27:2387-2395.
- Cariboni A, Pimpinelli F, Colamarino S, Zaninetti R, Piccolella M, Rumio C, Piva F, Rugarli EI, Maggi R. 2004. The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Hum Mol Genet.* 13:2781-2791.
- Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA. 1993. Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron.* 10:729-740.
- Casaccia-Bonnet P, Tikoo R, Kiyokawa H, Friedrich VJr, Chao MV, Koff A. 1997. Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Genes Dev.* 11:2335-2346.
- Chang A, Nishiyama A, Peterson J, Prineas J, Trapp BD. 2000. NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci.* 20:6404-6412.

- Charles P, Hernandez MP, Stankoff B, Aigrot MS, Colin C, Rougon G, Zalc B, Lubetzki C. 2000. Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:7585-7590.
- Chiaravello S, Dalmasso G, Bezin L, Marcel D, Jourdan F, Peretto P, Fasolo A, De Marchis S. 2007. BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci*. 26:1780-1790.
- Chothia C, Jones EY. 1997. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem*. 66:823-862.
- Chung WC, Moyle SS, Tsai PS. 2008. Fibroblast growth factor 8 signaling through fibroblast growth factor receptor 1 is required for the emergence of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 149:4997-5003.
- Clemente D, Esteban PF, Del Valle I, Bribián A, Soussi-Yanicostas N, Silva A, de Castro F. 2008. Expression pattern of Anosmin-1 during pre- and postnatal rat brain development. *Dev Dyn*. 237:2518-2528.
- Clemente D, Ortega MC, Arenzana FJ, de Castro F. 2011. FGF-2 and Anosmin-1 are selectively expressed in different types of multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*. 31:14899-14909.
- Cognato H, Ramachandrapa S, Olsen IM, ffrench-Constant C. 2004. Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *J Cell Biol*. 167:365-375.
- Conrad B, Kriebel J, Hetzel WD. 1978. Hereditary bimanual synkinesis combined with hypogonadotropic hypogonadism and anosmia in four brothers. *J Neurol*. 218:263-274.
- Corfas G, Roy K, Buxbaum JD. 2004. Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. *Nat Neurosci*. 7:575-580.
- de Castro F, Bribián A. 2005. The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Brain Res Rev*. 49:227-241.
- de Morsier G. 1954. Studies in cranio-encephalic dysraphia. I. Agenesis of the olfactory lobe (lateral telencephaloschisis) and of the callous and anterior commissures (median telencephaloschisis); olfacto-genital dysplasia. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr*. 74:309-361.
- de Morsier G, Gauthier G. 1963. Olfacto-genital dysplasia. *Pathol Biol (Paris)*. 11:1267-1272.
- del Castillo I, Cohen-Salmon M, Blanchard S, Lutfalla G, Petit C. 1992. Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. *Nat Genet*. 2:305-310.
- Dellovade TL, Hardelin JP, Soussi-Yanicostas N, Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M, Petit C. 2003. Anosmin-1 immunoreactivity during embryogenesis in a primitive eutherian mammal. *Brain Res Dev Brain Res*. 140:157-167.
- Demerens C, Stankoff B, Logak M, Anglade P, Allinquant B, Couraud F, Zalc B, Lubetzki C. 1996. Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:9887-9892.
- Dickinson CD, Veerapandian B, Dai XP, Hamlin RC, Xuong NH, Ruoslahti E, Ely KR. 1994. Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin. *J Mol Biol*. 236:1079-1092.
- Dodé C, Fouveaut C, Mortier G, Janssens S, Bertherat J, Mahoudeau J, Kottler ML, Chabrolle C, Gancel A, Francois I, Devriendt K, Wolczynski S, Pugeat M, Piñeiro-García A, Murat A, Bouchard P, Young J, Delpech M, Hardelin JP. 2007. Novel FGFR1 sequence variants in Kallmann syndrome, and genetic evidence that the FGFR1c isoform is required in olfactory bulb and palate morphogenesis. *Hum Mutat*. 28:97-98.
- Dodé C, Hardelin JP. 2009. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet*. 17:139-146.
- Dodé C, et al. 2003. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet*. 33:463-465.
- Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A, Morgan G, Murat A, Toubanc JE, Wolczynski S, Delpech M, Petit C, Young J, Hardelin JP. 2006. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet*. 2:e175.
- Duke VM, Winyard PJ, Thorogood P, Soothill P, Bouloux PM, Woolf AS. 1995. KAL, a gene mutated in Kallmann's syndrome, is expressed in the first

- trimester of human development. *Mol Cell Endocrinol.* 110:73-79.
- Dupree JL, Mason JL, Marcus JR, Stull M, Levinson R, Matsushima GK, Popko B. 2004. Oligodendrocytes assist in the maintenance of sodium channel clusters independent of the myelin sheath. *Neuron Glia Biol.* 1:179-192.
- Emery B. 2010. Transcriptional and post-transcriptional control of CNS myelination. *Curr Opin Neurobiol.* 20:601-607.
- Emery B, Agalliu D, Cahoy JD, Watkins TA, Dugas JC, Mulinyawe SB, Ibrahim A, Ligon KL, Rowitch DH, Barres BA. 2009. Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell.* 138:172-185.
- Endo Y, Ishiwata-Endo H, Yamada KM. 2012. Extracellular Matrix Protein Anosmin Promotes Neural Crest Formation and Regulates FGF, BMP, and WNT Activities. *Dev Cell.* 23:305-316.
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 126:677-689.
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:139-149.
- Fancy SP, Baranzini SE, Zhao C, Yuk DI, Irvine KA, Kaing S, Sanai N, Franklin RJ, Rowitch DH. 2009. Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev.* 23:1571-1585.
- Fancy SP, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJ, Rowitch DH. 2011. Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci.* 34:21-43.
- Farmer SF, Harrison LM, Mayston MJ, Parekh A, James LM, Stephens JA. 2004. Abnormal cortex-muscle interactions in subjects with X-linked Kallmann's syndrome and mirror movements. *Brain.* 127:385-397.
- Feigenson K, Reid M, See J, Crenshaw III EB, Grinspan JB. 2011. Canonical Wnt signalling requires the BMP pathway to inhibit oligodendrocyte maturation. *ASN Neuro.* 3:e00061.
- Flores AI, Narayanan SP, Morse EN, Shick HE, Yin X, Kidd G, Ávila RL, Kirschner DA, Macklin WB. 2008. Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *J Neurosci.* 28:7174-7183.
- Fortin D, Rom E, Sun H, Yayon A, Bansal R. 2005. Distinct fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor signaling pairs initiate diverse cellular responses in the oligodendrocyte lineage. *J Neurosci.* 25:7470-7479.
- Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, Carrozzo R, Maestrini E, Pieretti M, Taillon-Miller P, Brown CJ, Willard HF, Lawrence C, Graziella PM, Camerino G, Ballabio A. 1991. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature.* 353:529-536.
- Franco SJ, Muller U. 2011. Extracellular matrix functions during neuronal migration and lamination in the mammalian central nervous system. *Dev Neurobiol.* 71:889-900.
- Franklin RJ. 2002. Remyelination of the demyelinated CNS: the case for and against transplantation of central, peripheral and olfactory glia. *Brain Res Bull.* 57:827-832.
- Fricker-Gates RA, Winkler C, Kirik D, Rosenblad C, Carpenter MK, Bjorklund A. 2000. EGF infusion stimulates the proliferation and migration of embryonic progenitor cells transplanted in the adult rat striatum. *Exp Neurol.* 165:237-247.
- Frost E, Kiernan BW, Faissner A, French-Constant C. 1996. Regulation of oligodendrocyte precursor migration by extracellular matrix: evidence for substrate-specific inhibition of migration by tenascin-C. *Dev Neurosci.* 18:266-273.
- Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Bostrom H, Willetts K, Bertold CH, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD. 1999. Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development.* 126:457-467.
- Fulton D, Páez PM, Campagnoni AT. 2010. The multiple roles of myelin protein genes during the development of the oligodendrocyte. *ASN Neuro.* 2:e00027.
- Furdui CM, Lew ED, Schlessinger J, Anderson KS. 2006. Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. *Mol Cell.* 21:711-717.
- Furusho M, Dupree JL, Nave KA, Bansal R. 2012. Fibroblast growth factor receptor signaling in oligodendrocytes regulates myelin sheath thickness. *J Neurosci.* 32:6631-6641.

- Furusho M, Kaga Y, Ishii A, Hebert JM, Bansal R. 2011. Fibroblast growth factor signaling is required for the generation of oligodendrocyte progenitors from the embryonic forebrain. *J Neurosci.* 31:5055-5066.
- Gadea A, Schinelli S, Gallo V. 2008. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci.* 28:2394-2408.
- Gallea C, Popa T, Billot S, Meneret A, Depienne C, Roze E. 2011. Congenital mirror movements: a clue to understanding bimanual motor control. *J Neurol.* 258:1911-1919.
- García-González D, Clemente D, Coelho M, Esteban PF, Soussi-Yanicostas N, de Castro F. 2010. Dynamic roles of FGF-2 and Anosmin-1 in the migration of neuronal precursors from the subventricular zone during pre- and postnatal development. *Exp Neurol.* 222:285-295.
- García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Álvarez-Buylla A. 1998. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol.* 36:234-248.
- Garzotto D, Giacobini P, Crepaldi T, Fasolo A, De Marchis S. 2008. Hepatocyte growth factor regulates migration of olfactory interneuron precursors in the rostral migratory stream through Met-Grb2 coupling. *J Neurosci.* 28:5901-5909.
- Genoud S, Lappe-Siefke C, Goebbels S, Radtke F, Aguet M, Scherer SS, Suter U, Nave KA, Mantei N. 2002. Notch1 control of oligodendrocyte differentiation in the spinal cord. *J Cell Biol.* 158:709-718.
- Georgopoulos NA, Pralong FP, Seidman CE, Seidman JG, Crowley WF, Jr., Vallejo M. 1997. Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of KAL-1 gene mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:213-217.
- Ghiani CA, Eisen AM, Yuan X, DePinho RA, McBain CJ, Gallo V. 1999. Neurotransmitter receptor activation triggers p27(Kip1) and p21(CIP1) accumulation and G1 cell cycle arrest in oligodendrocyte progenitors. *Development.* 126:1077-1090.
- Giacobini P, Messina A, Morello F, Ferraris N, Corso S, Penachioni J, Giordano S, Tamagnone L, Fasolo A. 2008. Semaphorin 4D regulates gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration through PlexinB1-Met complex. *J Cell Biol.* 183:555-566.
- Gianola S, de Castro F, Rossi F. 2009. Anosmin-1 stimulates outgrowth and branching of developing Purkinje axons. *Neuroscience.* 158:570-584.
- Gibney SM, McDermott KW. 2007. Differentiation of oligodendrocytes in neurospheres derived from embryonic rat brain using growth and differentiation factors. *J Neurosci Res.* 85:1912-1920.
- Givogri MI, Costa RM, Schonmann V, Silva AJ, Campagnoni AT, Bongarzone ER. 2002. Central nervous system myelination in mice with deficient expression of Notch1 receptor. *J Neurosci Res.* 67:309-320.
- González-Martínez D, Kim SH, Hu Y, Guimond S, Schofield J, Winyard P, Vannelli GB, Turnbull J, Bouloux PM. 2004. Anosmin-1 modulates fibroblast growth factor receptor 1 signaling in human gonadotropin-releasing hormone olfactory neuroblasts through a heparan sulfate-dependent mechanism. *J Neurosci.* 24:10384-10392.
- González-Pérez O, Romero-Rodríguez R, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2009. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells.* 27:2032-2043.
- Govek EE, Hatten ME, Van Aelst L. 2011. The role of Rho GTPase proteins in CNS neuronal migration. *Dev Neurobiol.* 71:528-553.
- Graves JA, Wakefield MJ, Toder R. 1998. The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Hum Mol Genet.* 7:1991-1996.
- Grinspan JB, Edell E, Carpio DF, Beesley JS, Lavy L, Pleasure D, Golden JA. 2000. Stage-specific effects of bone morphogenetic proteins on the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol.* 43:1-17.
- Guimond SE, Turnbull JE. 1999. Fibroblast growth factor receptor signalling is dictated by specific heparan sulphate saccharides. *Curr Biol.* 9:1343-1346.
- Gunning P, Leavitt J, Muscat G, Ng SY, Kedes L. 1987. A human beta-actin expression vector system



- directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4831-4835.
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Shery-Padan R, Lledó PM, Götz M. 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci*. 8:865-872.
- Hanchate NK, et al. 2012. SEMA3A, a Gene Involved in Axonal Pathfinding, Is Mutated in Patients with Kallmann Syndrome. *PLoS Genet*. 8:e1002896.
- Hardelin JP. 2001. Kallmann syndrome: towards molecular pathogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 179:75-81.
- Hardelin JP, Dodé C. 2008. The complex genetics of Kallmann syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, et al. *Sex Dev*. 2:181-193.
- Hardelin JP, Julliard AK, Moniot B, Soussi-Yanicostas N, Verney C, Schwanzel-Fukuda M, Ayer-Le Lievre C, Petit C. 1999. Anosmin-1 is a regionally restricted component of basement membranes and interstitial matrices during organogenesis: implications for the developmental anomalies of X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Dev Dyn*. 215:26-44.
- Hardelin JP, Levilliers J, Blanchard S, Carel JC, Leutenegger M, Pinard-Bertelletto JP, Bouloux P, Petit C. 1993a. Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet*. 2:373-377.
- Hardelin JP, Levilliers J, Young J, Pholsena M, Legouis R, Kirk J, Bouloux P, Petit C, Schaison G. 1993b. Xp22.3 deletions in isolated familial Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 76:827-831.
- Hayakawa K, Pham LD, Som AT, Lee BJ, Guo S, Lo EH, Arai K. 2011. Vascular endothelial growth factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci*. 31:10666-10670.
- Hayakawa K, Seo JH, Pham LD, Miyamoto N, Som AT, Guo S, Kim KW, Lo EH, Arai K. 2012. Cerebral endothelial derived vascular endothelial growth factor promotes the migration but not the proliferation of oligodendrocyte precursor cells in vitro. *Neurosci Lett*. 513:42-46.
- He Y, Dupree J, Wang J, Sandoval J, Li J, Liu H, Shi Y, Nave KA, Casaccia-Bonnel P. 2007. The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron*. 55:217-230.
- Hill J, Elliott C, Colquhoun I. 1992. Audiological, vestibular and radiological abnormalities in Kallman's syndrome. *J Laryngol Otol*. 106:530-534.
- Howng SY, Avila RL, Emery B, Traka M, Lin W, Watkins T, Cook S, Bronson R, Davisson M, Barres BA, Popko B. 2010. ZFP191 is required by oligodendrocytes for CNS myelination. *Genes Dev*. 24:301-311.
- Hu H, Marton TF, Goodman CS. 2001. Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling. *Neuron*. 32:39-51.
- Hu JG, Fu SL, Wang YX, Li Y, Jiang XY, Wang XF, Qiu MS, Lu PH, Xu XM. 2008. Platelet-derived growth factor-AA mediates oligodendrocyte lineage differentiation through activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Neuroscience*. 151:138-147.
- Hu Y, Bouloux PM. 2010. Novel insights in FGFR1 regulation: lessons from Kallmann syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 21:385-393.
- Hu Y, Bouloux PM. 2011. X-linked GnRH deficiency: role of KAL-1 mutations in GnRH deficiency. *Mol Cell Endocrinol*. 346:13-20.
- Hu Y, González-Martínez D, Kim SH, Bouloux PM. 2004. Cross-talk of anosmin-1, the protein implicated in X-linked Kallmann's syndrome, with heparan sulphate and urokinase-type plasminogen activator. *Biochem J*. 384:495-505.
- Hu Y, Guimond SE, Travers P, Cadman S, Hohenester E, Turnbull JE, Kim SH, Bouloux PM. 2009. Novel mechanisms of fibroblast growth factor receptor 1 regulation by extracellular matrix protein anosmin-1. *J Biol Chem*. 284:29905-29920.
- Hu Y, Poopalasundaram S, Graham A, Bouloux PM. 2012. GnRH Neuronal Migration and Olfactory Bulb Neurite Outgrowth Are Dependent on FGF Receptor 1 Signaling, Specifically via the PI3K p110alpha Isoform in Chick Embryo. *Endocrinology*.
- Hu Y, Yu H, Shaw G, Pask AJ, Renfree MB. 2011. Kallmann syndrome 1 gene is expressed in the marsupial gonad. *Biol Reprod*. 84:595-603.
- Huang JK, Jarjour AA, French-Constant C, Franklin RJ. 2011. Retinoid X receptors as a potential avenue for regenerative medicine in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 11:467-468.

- Hudson ML, Kinnunen T, Cinar HN, Chisholm AD. 2006. C. elegans Kallmann syndrome protein KAL-1 interacts with syndecan and glypican to regulate neuronal cell migrations. *Dev Biol.* 294:352-365.
- Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV, Stewart CL, Fields RD. 2006. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron.* 49:823-832.
- Ishii A, Fyffe-Maricich SL, Furusho M, Miller RH, Bansal R. 2012. ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination. *J Neurosci.* 32:8855-8864.
- Jacobs EC, Reyes SD, Campagnoni CW, Irene GM, Kampf K, Handley V, Spreuer V, Fisher R, Macklin W, Campagnoni AT. 2009. Targeted overexpression of a golli-myelin basic protein isoform to oligodendrocytes results in aberrant oligodendrocyte maturation and myelination. *ASN Neuro.* 1.
- Jahn O, Tenzer S, Werner HB. 2009. Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol.* 40:55-72.
- Jarjour AA, Kennedy TE. 2004. Oligodendrocyte precursors on the move: mechanisms directing migration. *Neuroscientist.* 10:99-105.
- Jian B, Nagineni CN, Meleth S, Grizzle W, Bland K, Chaudry I, Raju R. 2009. Anosmin-1 involved in neuronal cell migration is hypoxia inducible and cancer regulated. *Cell Cycle.* 8:3770-3776.
- Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten H, van der Donk K, Seminara S, Bergman JE, Brunner HG, Crowley WF Jr, Hoefsloot LH. 2009. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin Genet.* 75:65-71.
- Jung KJ, Kim DW, Lee HN, Lee YS, Lee SJ, Che JH, Lee YH, Kang BC. 2011. The role of endothelin receptor A during myelination of developing oligodendrocytes. *J Korean Med Sci.* 26:92-99.
- Kallmann FJ, Schoenfeld WA, Barrera SE. 1944. The genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am J Ment Defic.* XLVIII:203-236.
- Kawamata H, Furihata T, Omotehara F, Sakai T, Horiuchi H, Shinagawa Y, Imura J, Ohkura Y, Tachibana M, Kubota K, Terano A, Fujimori T. 2003. Identification of genes differentially expressed in a newly isolated human metastasizing esophageal cancer cell line, T.Tn-AT1, by cDNA microarray. *Cancer Sci.* 94:699-706.
- Kessarri N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci.* 9:173-179.
- Kiernan BW, Gotz B, Faissner A, ffrench-Constant C. 1996. Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms. *Mol Cell Neurosci.* 7:322-335.
- Kim SH, Hu Y, Cadman S, Bouloux P. 2008. Diversity in fibroblast growth factor receptor 1 regulation: learning from the investigation of Kallmann syndrome. *J Neuroendocrinol.* 20:141-163.
- Kim SH, Turnbull J, Guimond S. 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 209:139-151.
- Kirk JM, Grant DB, Besser GM, Shalet S, Quinton R, Smith CS, White M, Edwards O, Bouloux PM. 1994. Unilateral renal aplasia in X-linked Kallmann's syndrome. *Clin Genet.* 46:260-262.
- Kiselyov VV, 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.
- Köenigkam-Santos M, de Castro M., Versiani BR, Diniz PR, Santos AC. 2010. Kallmann syndrome and mirror movements: White matter quantitative evaluation with magnetic resonance imaging. *J Neurol Sci.* 292:40-44.
- Köenigkam-Santos M, Santos AC, Borduqui T, Versiani BR, Hallak JE, Crippa JA, Castro M. 2008. Whole-brain voxel-based morphometry in Kallmann syndrome associated with mirror movements. *AJNR Am J Neuroradiol.* 29:1799-1804.
- Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Bruck W. 2008. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain.* 131:1749-1758.



- 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.
- Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Nait-Oumesmar B, Baron-Van Evercooren A. 2002. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and platelet-derived growth factor AB (PDGF AB) promote adult SVZ-derived oligodendrogenesis in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 20:390-403.
- Laitinen EM, Tommiska J, Sane T, Vaaralahti K, Toppari J, Raivio T. 2012. Reversible congenital hypogonadotropic hypogonadism in patients with CHD7, FGFR1 or GNRHR mutations. *PLoS One.* 7:e39450.
- Laitinen EM, Vaaralahti K, Tommiska J, Eklund E, Tervaniemi M, Valanne L, Raivio T. 2011. Incidence, phenotypic features and molecular genetics of Kallmann syndrome in Finland. *Orphanet J Rare Dis.* 6:41.
- Lee PR, Fields RD. 2009. Regulation of myelin genes implicated in psychiatric disorders by functional activity in axons. *Front Neuroanat.* 3:4.
- Lee X, Hu Y, Zhang Y, Yang Z, Shao Z, Qiu M, Pepinsky B, Miller RH, Mi S. 2011. Oligodendrocyte differentiation and myelination defects in OMgp null mice. *Mol Cell Neurosci.* 46:752-761.
- Legouis R, Cohen-Salmon M, del C, I, Levilliers J, Capy L, Mornow JP, Petit C. 1993. Characterization of the chicken and quail homologues of the human gene responsible for the X-linked Kallmann syndrome. *Genomics.* 17:516-518.
- Legouis R, Hardelin JP, Petit C, Ayer-Le Lievre C. 1994. Early expression of the KAL gene during embryonic development of the chick. *Anat Embryol (Berl).* 190:549-562.
- Li H, Lu Y, Smith HK, Richardson WD. 2007. Olig1 and Sox10 interact synergistically to drive myelin basic protein transcription in oligodendrocytes. *J Neurosci.* 27:14375-14382.
- Lieblich JM, Rogol AD, White BJ, Rosen SW. 1982. Syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann syndrome): clinical and laboratory studies in 23 cases. *Am J Med.* 73:506-519.
- Lois C, Álvarez-Buylla A. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2074-2077.
- Lu Z, Ku L, Chen Y, Feng Y. 2005. Developmental abnormalities of myelin basic protein expression in fyn knock-out brain reveal a role of Fyn in posttranscriptional regulation. *J Biol Chem.* 280:389-395.
- Luskin MB. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron.* 11:173-189.
- Lutz B, Kuratani S, Rugarli EI, Wawersik S, Wong C, Bieber FR, Ballabio A, Eichele G. 1994. Expression of the Kallmann syndrome gene in human fetal brain and in the manipulated chick embryo. *Hum Mol Genet.* 3:1717-1723.
- Ma DK, Kim WR, Ming GL, Song H. 2009. Activity-dependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1170:664-673.
- Maestre de San Juan A. 1856. Teratología: falta total de los nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien existía una atrofia congénita de los testículos y el miembro viril. *El Siglo Médico, Madrid.* 3:211-221.
- Maire CL, Wegener A, Kerninon C, Nait-Oumesmar B. 2010. Gain-of-function of Olig transcription factors enhances oligodendrogenesis and myelination. *Stem Cells.* 28:1611-1622.
- McCarthy KD, de Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 85:890-902.
- Mallon BS, Shick HE, Kidd GJ, Macklin WB. 2002. Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci.* 22:876-885.
- Mangs A, Morris BJ. 2007. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr Genomics.* 8:129-136.
- Marín O, Rubenstein JL. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci.* 26:441-483.
- Martin C, Balasubramanian R, Dwyer AA, Au MG, Sidis Y, Kaiser UB, Seminara SB, Pitteloud N, Zhou

- QY, Crowley WF, Jr. 2011. The role of the prokineticin 2 pathway in human reproduction: evidence from the study of human and murine gene mutations. *Endocr Rev.* 32:225-246.
- Mason I, Chambers D, Shamim H, Walshe J, Irving C. 2000. Regulation and function of FGF8 in patterning of midbrain and anterior hindbrain. *Biochem Cell Biol.* 78:577-584.
- Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Matsuo A, Ishii H, Kobori M, Katoh M, Matsushime H, Furuichi K, Shigeyoshi Y. 2006. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:4140-4145.
- Matsuo T, Okamoto S, Izumi Y, Hosokawa A, Takegawa T, Fukui H, Tun Z, Honda K, Matoba R, Tatsumi K, Amino N. 2000. A novel mutation of the KAL1 gene in monozygotic twins with Kallmann syndrome. *Eur J Endocrinol.* 143:783-787.
- Maya-Núñez G, Zenteno JC, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Méndez JP. 1998. A recurrent missense mutation in the KAL gene in patients with X-linked Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:1650-1653.
- McCarthy KD, de Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 85:890-902.
- Mekki-Dauriac S, Agius E, Kan P, Cochard P. 2002. Bone morphogenetic proteins negatively control oligodendrocyte precursor specification in the chick spinal cord. *Development.* 129:5117-5130.
- Menn B, García-Verdugo JM, Yaschine C, González-Pérez O, Rowitch D, Álvarez-Buylla A. 2006. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci.* 26:7907-7918.
- Merchán P, Bribián A, Sánchez-Camacho C, Lezameta M, Bovolenta P, de Castro F. 2007. Sonic hedgehog promotes the migration and proliferation of optic nerve oligodendrocyte precursors. *Mol Cell Neurosci* 36:355-368.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA. 2004. Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science.* 304:700-703.
- Mihara M, Yoshida Y, Tsukamoto T, Inada K, Nakanishi Y, Yagi Y, Imai K, Sugimura T, Tatematsu M, Ushijima T. 2006. Methylation of multiple genes in gastric glands with intestinal metaplasia: A disorder with polyclonal origins. *Am J Pathol.* 169:1643-1651.
- Miki T, Bottaro DP, Fleming TP, Smith CL, Burgess WH, Chan AM, Aaronson SA. 1992. Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:246-250.
- Miller RH. 1996. Oligodendrocyte origins. *Trends Neurosci.* 19:92-96.
- Miller RH. 2002. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol.* 67:451-467.
- Milner R, Edwards G, Streuli C, ffrench-Constant C. 1996. A role in migration for the alpha V beta 1 integrin expressed on oligodendrocyte precursors. *J Neurosci.* 16:7240-7252.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. 2002. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 22:9742-9753.
- Monnier C, Dodé C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin JP, Hardelin JP, Rondard P. 2009. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum Mol Genet.* 18:75-81.
- Moors M, Cline JE, Abel J, Fritsche E. 2007. ERK-dependent and -independent pathways trigger human neural progenitor cell migration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 221:57-67.
- Naftolin F, Harris GW, Bobrow M. 1971. Effect of purified luteinizing hormone releasing factor on normal and hypogonadotrophic anosmic men. *Nature.* 232:496-497.
- Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY. 2005. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science.* 308:1923-1927.
- O'Leary MT, Hinks GL, Charlton HM, Franklin RJ. 2002. Increasing local levels of IGF-I mRNA expression using adenoviral vectors does not alter oligodendrocyte remyelination in the CNS of aged rats. *Mol Cell Neurosci.* 19:32-42.

- Ohya W, Funakoshi H, Kurosawa T, Nakamura T. 2007. Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during postnatal development in the rat. *Brain Res.* 1147:51-65.
- Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, Hayes FJ, Valkenburgh SB, Schipani E, Costa EM, Latronico AC, Crowley WFJr, Vallejo M. 2001. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:1532-1538.
- Olivier C, Cobos I, Pérez Villegas EM, Spassky N, Zalc B, Martínez S, Thomas JL. 2001. Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development.* 128:1757-1769.
- Ornitz DM. 2000. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays.* 22:108-112.
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem.* 271:15292-15297.
- Ortega MC, Bribián A, Peregrin S, Gil MT, Marín O, de Castro F. 2012. Neuregulin-1/ErbB4 signaling controls the migration of oligodendrocyte precursor cells during development. *Exp Neurol.* 235:610-620.
- Palsler AL, Norman AL, Saffell JL, Reynolds R. 2009. Neural cell adhesion molecule stimulates survival of premyelinating oligodendrocytes via the fibroblast growth factor receptor. *J Neurosci Res.* 87:3356-3368.
- Paratcha G, Ibáñez CF, Ledda F. 2006. GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Mol Cell Neurosci.* 31:505-514.
- Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Second Edition, Academic Press, 2001.
- Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing A, Eliseenkova AV, Ma J, Ibrahim OA, Metzger DL, Hayes FJ, Dwyer AA, Hughes VA, Yialamas M, Hall JE, Grant E, Mohammadi M, Crowley WFJr. 2006. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:6281-6286.
- Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing AU, Dwyer AA, Hayes FJ, Crowley WFJr. 2005. Reversible kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:1317-1322.
- Poliak S, Peles E. 2003. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci.* 4:968-980.
- Pringle NP, Mudhar HS, Collarini EJ, Richardson WD. 1992. PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development* 115:535-551.
- Prosser HM, Bradley A, Caldwell MA. 2007. Olfactory bulb hypoplasia in Prokr2 null mice stems from defective neuronal progenitor migration and differentiation. *Eur J Neurosci.* 26:3339-3344.
- Puelles L, Martínez S, Martínez de la Torre M. *Neuroanatomía*. Buenos Aires; Madrid: Ed. Médica Panamericana, 2008. ISBN 978-84-7903-453-5.
- Qi Y, Stapp D, Qiu M. 2002. Origin and molecular specification of oligodendrocytes in the telencephalon. *Trends Neurosci.* 25:223-225.
- Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, de Zoysa PA, Azcona C, MacColl GS, Jacobs HS, Conway GS, Besser M, Stanhope RG, Bouloux PM. 2001. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol (Oxf).* 55:163-174.
- Raju R, Dalakas MC. 2005. Gene expression profile in the muscles of patients with inflammatory myopathies: effect of therapy with IVIg and biological validation of clinically relevant genes. *Brain.* 128:1887-1896.
- Redwine JM, Blinder KL, Armstrong RC. 1997. In situ expression of fibroblast growth factor receptors by oligodendrocyte progenitors and oligodendrocytes in adult mouse central nervous system. *J Neurosci Res.* 50:229-237.
- Relvas JB, Setzu A, Baron W, Buttery PC, LaFlamme SE, Franklin RJ, French-Constant C. 2001. Expression of dominant-negative and chimeric subunits reveals an essential role for beta1 integrin during myelination. *Curr Biol.* 11:1039-1043.

- Robaglia-Schlupp A, Pizant J, Norreel JC, Passage E, Saberán-Djoneidi D, Ansaldi JL, Vinay L, Figarella-Branger D, Levy N, Clarac F, Cau P, Pellissier JF, Fontes M. 2002. PMP22 overexpression causes dysmyelination in mice. *Brain*. 125:2213-2221.
- Robertson A, MacColl GS, Nash JA, Boehm MK, Perkins SJ, Bouloux PM. 2001. Molecular modelling and experimental studies of mutation and cell-adhesion sites in the fibronectin type III and whey acidic protein domains of human anosmin-1. *Biochem J*. 357:647-659.
- Ross MT, et al. 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. 434:325-337.
- Rowitch DH. 2004. Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci*. 5:409-419.
- Rowitch DH, Kriegstein AR. 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*. 468:214-222.
- Rugarli EI, Di SE, Hilliard MA, Arbucci S, Ghezzi C, Faccioli A, Coppola G, Ballabio A, Bazzicalupo P. 2002. The Kallmann syndrome gene homolog in *C. elegans* is involved in epidermal morphogenesis and neurite branching. *Development*. 129:1283-1294.
- Rugarli EI, Ghezzi C, Valsecchi V, Ballabio A. 1996. The Kallmann syndrome gene product expressed in COS cells is cleaved on the cell surface to yield a diffusible component. *Hum Mol Genet*. 5:1109-1115.
- Rugarli EI, Lutz B, Kuratani SC, Wawersik S, Borsani G, Ballabio A, Eichele G. 1993. Expression pattern of the Kallmann syndrome gene in the olfactory system suggests a role in neuronal targeting. *Nat Genet*. 4:19-26.
- Rushton WA. 1951. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J Physiol*. 115:101-122.
- Rusnati M, Tanghetti E, Dell'Era P, Gualandris A, Presta M. 1997.  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin mediates the cell-adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 8:2449-2461.
- Sakai T, Larsen M, Yamada KM. 2003. Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature*. 423:876-881.
- Sato N, Katsumata N, Kagami M, Hasegawa T, Hori N, Kawakita S, Minowada S, Shimotsuka A, Shishiba Y, Yokozawa M, Yasuda T, Nagasaki K, Hasegawa D, Hasegawa Y, Tachibana K, Naiki Y, Horikawa R, Tanaka T, Ogata T. 2004. Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:1079-1088.
- Schlessinger J, Ullrich A. 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*. 9:383-391.
- Schwankhaus JD, Currie J, Jaffe MJ, Rose SR, Sherins RJ. 1989. Neurologic findings in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Neurology*. 39:223-226.
- Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. 1989. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res*. 6:311-326.
- See J, Zhang X, Eraydin N, Mun SB, Mamontov P, Golden JA, Grinspan JB. 2004. Oligodendrocyte maturation is inhibited by bone morphogenetic protein. *Mol Cell Neurosci*. 26:481-492.
- Segarra J, Balenci L, Drenth T, Maina F, Lamballe F. 2006. Combined signaling through ERK, PI3K/AKT, and RAC1/p38 is required for met-triggered cortical neuron migration. *J Biol Chem*. 281:4771-4778.
- Shapiro LJ, Mohandas T, Weiss R, Romeo G. 1979. Non-inactivation of an x-chromosome locus in man. *Science*. 204:1224-1226.
- Simpson PB, Armstrong RC. 1999. Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration. *Glia*. 26:22-35.
- Soussi-Yanicostas N, de Castro F, Julliard AK, Perfettini I, Chédotal A, Petit C. 2002. Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell*. 109:217-228.
- Soussi-Yanicostas N, Faivre-Sarrailh C, Hardelin JP, Levilliers J, Rougon G, Petit C. 1998. Anosmin-1 underlying the X chromosome-linked Kallmann syndrome is an adhesion molecule that can modulate neurite growth in a cell-type specific manner. *J Cell Sci*. 111 ( Pt 19):2953-2965.
- Soussi-Yanicostas N, Hardelin JP, Arroyo-Jiménez MM, Ardouin O, Legouis R, Levilliers J, Traincard F,

- Betton JM, Cabanie L, Petit C. 1996. Initial characterization of anosmin-1, a putative extracellular matrix protein synthesized by definite neuronal cell populations in the central nervous system. *J Cell Sci.* 109 ( Pt 7):1749-1757.
- Sow A, Lamant M, Bonny JM, Larvaron P, Piaud O, Lecureuil C, Fontaine I, Saleh MC, Garcia Otin AL, Renou JP, Baron B, Zakin M, Guillou F. 2006. Oligodendrocyte differentiation is increased in transferrin transgenic mice. *J Neurosci Res.* 83:403-414.
- Spassky N, de Castro F, Le Bras B, Heydon K, Queraud-LeSaux F, Bloch-Gallego E, Chédotal A, Zalc B, Thomas JL. 2002. Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J Neurosci.* 22:5992-6004.
- Stankoff B, Aigrot MS, Noël F, Wattilliaux A, Zalc B, Lubetzki C. 2002. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J Neurosci.* 22:9221-9227.
- Steinhauser C, Gallo V. 1996. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.* 19:339-345.
- Sugimoto Y, Taniguchi M, Yagi T, Akagi Y, Nojyo Y, Tamamaki N. 2001. Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. *Development.* 128:3321-3330.
- Tanaka H, Ma J, Tanaka KF, Takao K, Komada M, Tanda K, Suzuki A, Ishibashi T, Baba H, Isa T, Shigemoto R, Ono K, Miyakawa T, Ikenaka K. 2009. Mice with altered myelin proteolipid protein gene expression display cognitive deficits accompanied by abnormal neuron-glia interactions and decreased conduction velocities. *J Neurosci.* 29:8363-8371.
- Tengara S, Tominaga M, Kamo A, Taneda K, Negi O, Ogawa H, Takamori K. 2010. Keratinocyte-derived anosmin-1, an extracellular glycoprotein encoded by the X-linked Kallmann syndrome gene, is involved in modulation of epidermal nerve density in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 58:64-71.
- Toledo MS, Suzuki E, Handa K, Hakomori S. 2005. Effect of ganglioside and tetraspanins in microdomains on interaction of integrins with fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem.* 280:16227-16234.
- Tornberg J, Sykietis GP, Keefe K, Plummer L, Hoang X, Hall JE, Quinton R, Seminara SB, Hughes V, Van Vliet G, Van Uum S, Crowley WF, Habuchi H, Kimata K, Pitteloud N, Bülow HE. 2011. Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:11524-11529.
- Trapp BD, Bo L, Mork S, Chang A. 1999. Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol.* 98:49-56.
- Trarbach EB, Abreu AP, Silveira LF, Garmes HM, Baptista MT, Teles MG, Costa EM, Mohammadi M, Pitteloud N, Mendonca BB, Latronico AC. 2010. Nonsense mutations in FGF8 gene causing different degrees of human gonadotropin-releasing deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 95:3491-3496.
- Tsai HH, Tessier-Lavigne M, Miller RH. 2003. Netrin 1 mediates spinal cord oligodendrocyte precursor dispersal. *Development.* 130:2095-2105.
- Tsai PS, Gill JC. 2006. Mechanisms of disease: Insights into X-linked and autosomal-dominant Kallmann syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2:160-171.
- Vaarahti K, Raivio T, Koivu R, Valanne L, Laitinen EM, Tommiska J. 2012. Genetic Overlap between Holoprosencephaly and Kallmann Syndrome. *Mol Syndromol.* 3:1-5.
- Vora P, Pillai PP, Zhu W, Mustapha J, Namaka MP, Frost EE. 2011. Differential effects of growth factors on oligodendrocyte progenitor migration. *Eur J Cell Biol.* 90:649-656.
- Wang S, Sdrulla AD, diSibio G, Bush G, Nofziger D, Hicks C, Weinmaster G, Barres BA. 1998. Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron.* 21:63-75.
- Wang SZ, Dulin J, Wu H, Hurlock E, Lee SE, Jansson K, Lu QR. 2006. An oligodendrocyte-specific zinc-finger transcription regulator cooperates with Olig2 to promote oligodendrocyte differentiation. *Development.* 133:3389-3398.
- Wang X, Harris RE, Bayston LJ, Ashe HL. 2008. Type IV collagens regulate BMP signalling in *Drosophila*. *Nature.* 455:72-77.
- Waxman SG. 1980. Determinants of conduction velocity in myelinated nerve fibers. *Muscle Nerve.* 3:141-150.



- Waxman SG. 1997. Axon-glia interactions: building a smart nerve fiber. *Curr Biol.* 7:R406-R410.
- Werner S, Duan DS, de VC, Peters KG, Johnson DE, Williams LT. 1992. Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol Cell Biol.* 12:82-88.
- Whitlock KE, Smith KM, Kim H, Harden MV. 2005. A role for *foxd3* and *sox10* in the differentiation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the zebrafish *Danio rerio*. *Development.* 132:5491-5502.
- Williams A, Piaton G, Aigrot MS, Belhadi A, Theaudin M, Petermann F, Thomas JL, Zalc B, Lubetzki C. 2007. Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain.* 130:2554-2565.
- Wolswijk G. 1998. Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci.* 18:601-609.
- Woodruff RH, Fruttiger M, Richardson WD, Franklin RJ. 2004. Platelet-derived growth factor regulates oligodendrocyte progenitor numbers in adult CNS and their response following CNS demyelination. *Mol Cell Neurosci.* 25:252-262.
- Wray S, Nieburgs A, Elkabes S. 1989. Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone-releasing hormone in the prenatal mouse: evidence for an embryonic origin in the olfactory placode. *Brain Res Dev Brain Res.* 46:309-318.
- Xiao J, Ferner AH, Wong AW, Denham M, Kilpatrick TJ, Murray SS. 2012. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling promotes oligodendrocyte myelination in vitro. *J Neurochem.* 122:1167-1180.
- Xin M, Yue T, Ma Z, Wu FF, Gow A, Lu QR. 2005. Myelinogenesis and axonal recognition by oligodendrocytes in brain are uncoupled in *Olig1*-null mice. *J Neurosci.* 25:1354-1365.
- Xu N, Kim HG, Bhagavath B, Cho SG, Lee JH, Ha K, Meliciani I, Wenzel W, Podolsky RH, Chorich LP, Stackhouse KA, Grove AM, Odom LN, Ozata M, Bick DP, Sherins RJ, Kim SH, Cameron RS, Layman LC. 2011. Nasal embryonic LHRH factor (NELF) mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril.* 95:1613-1620.
- Yamazaki Y, Hozumi Y, Kaneko K, Sugihara T, Fujii S, Goto K, Kato H. 2007. Modulatory effects of oligodendrocytes on the conduction velocity of action potentials along axons in the alveus of the rat hippocampal CA1 region. *Neuron Glia Biol.* 3:325-334.
- Yanicostas C, Herbomel E, Dipietromaria A, Soussi-Yanicostas N. 2009. Anosmin-1a is required for fasciculation and terminal targeting of olfactory sensory neuron axons in the zebrafish olfactory system. *Mol Cell Endocrinol.* 312:53-60.
- Yayon A, Zimmer Y, Shen GH, Avivi A, Yarden Y, Givol D. 1992. A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold. *EMBO J.* 11:1885-1890.
- Yen PH, Ellison J, Salido EC, Mohandas T, Shapiro L. 1992. Isolation of a new gene from the distal short arm of the human X chromosome that escapes X-inactivation. *Hum Mol Genet.* 1:47-52.
- Young J, Metay C, Bouligand J, Tou B, Francou B, Maione L, Tosca L, Sarfati J, Brioude F, Esteva B, Briand-Suleau A, Brisset S, Goossens M, Tachdjian G, Guiochon-Mantel A. 2012. SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development. *Hum Reprod.* 27:1460-1465.
- Yu WP, Collarini EJ, Pringle NP, Richardson WD. 1994. Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron.* 12:1353-1362.
- Zhang H, Vutskits L, Calaora V, Durbec P, Kiss JZ. 2004. A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Sci.* 117:93-103.