



Estudio de las vías de señalización intracelular asociadas a las proteínas inhibitorias de la mielina

Oscar Seira Oriach

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR

**ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR ASOCIADAS
A LAS PROTEÍNAS INHIBITORIAS DE LA MIELINA**

Oscar Seira Oriach

Barcelona, 2012



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR

**ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR ASOCIADAS
A LAS PROTEÍNAS INHIBITORIAS DE LA MIELINA**

Memoria presentada por **Oscar Seira Oriach**, licenciado en Biología, para optar al grado de Doctor.

Esta tesis ha sido inscrita dentro del programa de doctorado de Biomedicina, bienio 2008-2009 de la Universitat de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados bajo la dirección del Dr. José Antonio del Río Fernández, Catedrático de Biología Celular del Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, 2012

Director de la tesis

Dr. José Antonio del Río Fernández

El doctorando

Oscar Seira Oriach

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i-vi
INTRODUCCIÓN.....	1
I. Regeneración axonal.....	1
1.1 Bases de la limitación de la capacidad regenerativa del Sistema Nervioso Central.....	2
1.1.1 La cicatriz meningo-glial.....	4
1.1.2 Proteínas inhibitorias no asociadas a mielina.....	7
1.1.3 Proteínas asociadas a mielina.....	13
1.2 Plasticidad después de lesión/potencial neuronal para la regeneración del SNC.....	15
1.3 Modelos de lesión y estrategias para la regeneración.....	16
1.3.1 Modelos de lesión.....	16
1.3.2 Aproximaciones experimentales para la promoción de la regeneración.....	17
II. Inhibidores Asociados a la Mielina (MAIs) y Receptores.....	26
2.1 Inhibidores Asociados a la Mielina	26
2.1.1 Nogo-A.....	26
2.1.2 MAG.....	31
2.1.3 OMgp.....	34
2.2 Receptores.....	37
2.2.1 NgR1.....	37
2.2.2 p75 ^{NTR} /TROY/Lingo-1.....	39
2.2.3 PirB.....	42
III. Señalización intracelular.....	45
3.1 Modificaciones del citoesqueleto neuronal.....	45
3.1.1 Citoesqueleto de actina.....	46
3.1.2 Citoesqueleto microtubular y sus quinasas.....	48
3.2 Modificaciones transcripcionales.....	58

IV. Microfluídica: Combinando microtecnología y neurobiología.....	59
4.1 Litografía Blanda (<i>Soft Litography</i>).....	60
4.2 Nueva aproximación a la electrofisiología: E ² dish [®] <i>Technology</i>	63
OBJETIVOS.....	69
MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
RESULTADOS.....	85
Capítulo I.....	85
<i>Análisis del efecto de la mielina sobre cultivos de Neurona Granulares del Cerebelo (CGNs)</i>	
Capítulo II.....	98
<i>Análisis del efecto de la axotomía de la vía Entorrino-Hipocámpica (EHP) en cultivos organotípicos</i>	
Capítulo III.....	108
<i>Papel de OMgp en plasticidad sináptica</i>	
DISCUSIÓN.....	119
I. GSK3 β y regeneración axonal.....	119
a. Activación quinasa diferencial tras el tratamiento con mielina y axotomía <i>in vitro</i> : análisis de los modelos para el estudio de la regeneración.....	119
- Neuronas Granulares del Cerebelo (CGNs).....	120
- Cultivos organotípicos Entorrino-Hipocámpicos (EH).....	121
II. GSK3 β ¿Clave en la regeneración axonal?.....	123
a. GSK3 β y el crecimiento axonal: GSK3 β en la modificación del citoesqueleto neuronal.....	128
b. <i>Controvertida participación de GSK3β en la inhibición del crecimiento axonal</i>	129
c. Miembros del citoesqueleto: la familia de las Collapsn Related Mediated Proteins (CRMPs).....	136
d. Diversidad de condiciones y modelos: diversidad de resultados	
e. GSK3 β y las modificaciones transcripcionales.....	138

III. La vía de las p38 MAPK, una posible vía complementaria.....	142
IV. ¿Podría OMgp estar ayudando a las neuronas a modular la transmisión sináptica?.....	145
CONCLUSIONES.....	151
BIBLIOGRAFÍA.....	155

ABREVIATURAS

AMPC	AMP cíclico
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
APs	Action Potentials
BLyS	B lymphocyte stimulator
Cdk5	Cyclin-dependent kinase 5
CGN	Cerebelar Granule Neurons
CK2	Caseina quinasa II
CLASP	Cytoplasmatic Linker Proteins (CLIP)-associated protein
CRMPs	Collapsin Response Mediator Proteins
CRT	Corticospinal tract
CSPG	Chondrotin Sulphate ProteoGlycan
DAL	Days After Lesion
DAT	Dopamine Transporter
DD	Death Domain
DG	Giro Dentado
DIV	Días <i>in vitro</i>
DRG	Dorsal Root Ganglion
EC	Entorhinal Cortex
EGFr	Epidermal Growth Factor receptor
EH	Entorhino Hippocampic
EHP	Vía Entorrino-Hipocámpica
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated Kinase
ESC	Embrionic Stem Cell
GAG	GlucosAminoGlucanos
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GPI	dominio glucosilfosfatidil inositol
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
Ig CAMs	Immunoglobulines Cell Adhesion Molecule

iml	inner molecular layer
IN-1	Inhibition Neutralization-1
ITIMs	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs
LAR	Leukocyte Common Antigen-Related Phosphatase
LC	Light Chain
LERN1	Leucine-rich repeat neuronal protein 1
LiLR	Leucocyte immunoglobulin-Like receptor
Lingo-1	LRR and Ig domain-containing, Nogo Receptor interacting protein
LRR	Leucin rich repeat
Lrrn6a	Leucine rich repeat neuronal 6a
LTD	Long Term Depression
LTP	Long Term Potentiation
MAG	Myelin-Associated Glycoprotein
MAIs	Proteínas inhibitorias asociadas a mielina
MAP	Microtubule Associated Protein
MBP	Myelin Basic Protein
MEA	Micro-Electron Array
MHC1	Major Histocompatibility Complex Class I
MK2	MAPK-activated protein kinase 2
mml	medial molecular layer
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
Myt1l	Myelin transcription factor 1-like
NEP1-40	Nogo Extracellular Peptide, residues 1-40
NgR1	Nogo Receptor 1
NI-250	Neurite growth Inhibitor-250
NI-35	Neurite growth Inhibitor-35
OA	Okadaic Acid
OEC	Olfactory Ensheathing cell
OMgp	Oligodendrocyte Myelin glycoprotein

oml	outer molecular layer
PDMS	Polidimetilsiloxane
PDPK	Proteínas quinasa dirigidas por prolina
PirB	Paired-inmunoglobulin-like receptor B
PKB	Protein Kinase B
POSH	Scaffold Protein Plenty of SH3s
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPSE	Potencial Postsináptico excitatorio
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTPσ	Protein Tyrosine Phosphatase σ
RE	Retículo Endoplasmático
RGC	Retinal Ganglionar Cells
RHD	Reticulon-Homology Domain
RTN	familia de proteínas Reticulon
SCI	Spinal Cord Injury
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SSH	Slingshot Phosphatase
TAJ	Toxicity and JNK inducer
TAT	Transactivador de la Transcripción
TBI	Traumatic Brain Injury
TH	Tyrosine Hidroxilase
TM	Transmembrana
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAF2	Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2
TROY	TNFRSF expressed on the mouse embryo
TTX	Tetrodotoxine

WNK	With No lysine (K)
WNK1	With No Lysine K
ZSV	Zona SubVentricular
ZV	Zona Ventricular

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN I

Regeneración axonal

No cabe duda de que el legado de Santiago Ramón y Cajal sustentó las bases de la neurobiología moderna, y tanto sus estudios como los de sus discípulos sobre degeneración y regeneración del sistema nervioso han constituido un punto de partida para las investigaciones actuales sobre reparación del sistema nervioso lesionado. Cajal y sobre todo Tello, su discípulo, hicieron reveladoras observaciones en lo referente a la capacidad regenerativa de los sistemas nerviosos periférico y central (Cajal SR, 1913,1914) que han servido de base para las numerosas investigaciones que se han sucedido a lo largo del siglo XX hasta nuestros días (Cajal SR, 1913,1914).

Por primera vez, estos científicos pioneros describieron cómo el sistema nervioso periférico (SNP) y el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos no respondían de la misma manera frente a las lesiones traumáticas. Así, mientras en el SNP las neuronas son capaces de regenerar espontáneamente sus axones y, en algunos casos alcanzar sus dianas restableciéndose el contacto sináptico con ellas, en el caso del SNC los axones dañados carecían de dicha capacidad (Figura 1).



Figura 1. Neuronas piramidales del cerebro con colaterales arciformes hipertróficas de los axones seccionados. Adaptado de "Degeneración y regeneración del sistema nervioso", Ramón y Cajal, 1913-1914.

A partir de dichas observaciones, Tello y sus colaboradores decidieron realizar injertos de nervios periféricos, que parecían contener un ambiente permisivo, en zonas del SNC lesionado para intentar promover la regeneración. Efectivamente los axones crecieron en el interior de los injertos pero luego fueron incapaces de salir de los mismos y progresar hacia sus dianas. El resultado de estos

experimentos llevó a Cajal a vaticinar que “El cerebro era algo fijo e inmutable en el que todo podía morir y nada se podía regenerar” (Cajal SR, 1913,1914).

Muchos científicos en años posteriores no se atrevieron a continuar con los trabajos de Cajal debido al pesimismo de su dogma, y no fue hasta principios de los 80 en que Alberto Aguayo y colaboradores retomaron algunos de sus estudios de regeneración (ej., (Aguayo et al., 1981)).

Desde entonces y hasta hoy en día, la mayoría de estrategias seguidas por los científicos, para intentar promover la regeneración, han estado basadas en proporcionar a las neuronas lesionadas los factores tróficos adecuados para la supervivencia, en la facilitación de un ambiente permisivo a los axones dañados o bien en el bloqueo de los inhibidores del crecimiento axonal (vea (Horner and Gage, 2000, Schwab, 2002) para revisión).

1.1. Bases de la limitación de la capacidad regenerativa del Sistema Nervioso Central

Como ya ha sido comentado, Cajal y sus discípulos demostraron que la capacidad regenerativa de las neuronas del SNC adulto después de lesión era extremadamente limitada. Sin embargo, las neuronas embrionarias del SNC en muchos vertebrados son capaces de regenerar después de severos traumatismos, como en el caso de la recuperación funcional completa tras una transección total de la médula espinal en embriones de pollo (Shimizu et al., 1990).

Las lesiones traumáticas tanto en cerebro como en médula espinal a menudo resultan en un daño axonal importante. Mientras que el cuerpo neuronal y el segmento proximal del axón de la neurona lesionada sobreviven, el segmento distal del axón experimenta una degeneración de tipo progresivo y anterógrado, conocido como degeneración Walleriana. La pérdida axonal afecta al balance bioquímico entre axones y oligodendrocitos y se produce una acumulación de restos celulares en degeneración ricos en mielina. A pesar de que este tipo de degeneración también tiene lugar en el SNP, en este caso del SNP el ambiente parece ser más permisivo. (Figura 2) (He and Koprivica, 2004, Adalbert et al., 2005). Así pues, mientras en el SNP la degeneración Walleriana es más

rápida, en el caso del SNC, la mielina en degeneración persiste durante meses o incluso años (Miklossy and Van der Loos, 1991, George and Griffin, 1994, Buss and Schwab, 2003, Buss et al., 2005). Entonces, ¿por qué difieren tanto las capacidades regenerativas entre axones del SNP y del SNC? Parece ser

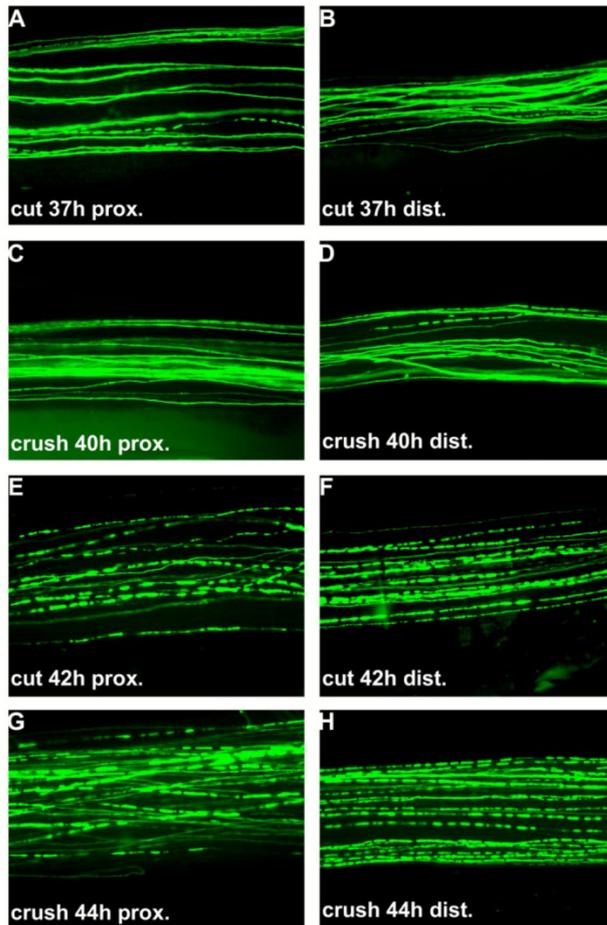


Figura 2. La degeneración Walleriana después de lesión por axotomía o aplastamiento (*crush*) empieza repentinamente en axones individuales e implica la fragmentación total de los mismos a las pocas horas. Microfotografías de fluorescencia con la proteína fluorescente amarilla YFP (del inglés, *Yellow Fluorescent Protein*) de segmentos de nervio ciático proximales y distales. Como se puede apreciar es a partir de las 42 horas cuando se produce una fragmentación masiva de los axones tanto en situación de axotomía como en aplastamiento. Coloración modificada con software de imagen. Magnificación: 100 × Adaptado de Adalbert et al. 2005

que la presencia específica de diferentes tipos de células gliales es crucial en este aspecto.

La mielina es producida por dos tipos de células gliales, las células de Schwann en el caso del SNP o bien los oligodendrocitos en el caso del SNC. Después de lesión o daño en el SN se produce la eliminación de los restos de mielina, y es en este punto en donde la diferencia entre células gliales es clave en la diferencia de permisividad observada entre el SNC y el SNP.

En el caso de las células de Schwann una de sus funciones principales es la fagocitosis de los restos que provienen de la envuelta de mielina en el SNP (Fernandez-Valle et al., 1995), además de contribuir a la degradación de su propia mielina y realizar una acción quimioatrayente para los

macrófagos mediante la liberación de quimioquinas o citoquinas (Shamash et al., 2002). Tanto las células de Schwann mielinizadas como las no mielinizadas, después del inicio del proceso de degeneración axonal, entran

rápidamente en proliferación siendo éste, también, un evento clave en la promoción de la regeneración axonal (Murinson et al., 2005).

Por el contrario, los oligodendrocitos tienen una escasa o nula capacidad para la eliminación de los restos axonales y de mielina (Ludwin, 1990). Además, precisan de señales axonales específicas para su supervivencia (Barres et al., 1993). A pesar de que recientemente se ha observado que en caso de lesión de médula espinal se produce un incremento en el número de nuevos oligodendrocitos, dicha proliferación es insuficiente para producir una remielinización de los axones lesionados (Barnabe-Heider et al., 2010).

Aunque también existen factores intrínsecos, como la incapacidad de las neuronas adultas del SNC para recapitular su programa de desarrollo, son los factores extrínsecos, relacionados con la respuesta glial que se genera en la zona de lesión, la principal causa del fallo en la regeneración axonal (ej. cicatriz glial, proteínas no asociadas a mielina y asociadas a mielina entre otros).

1.1.1. La cicatriz meningo-glial

La cicatriz glial es una estructura envolvente con diferentes tipos celulares que llegan y participan en ella a diferentes tiempos. Los principales tipos celulares involucrados son los astrocitos, microglía y los precursores de los oligodendrocitos. También participan algunas células meníngeas y células madre, principalmente en lesiones de mayor gravedad en las que se produce una afectación de las meninges. En esta última situación los fibroblastos también se infiltran en el tejido neuronal (Fawcett and Asher, 1999, Fitch and Silver, 2008).

Transcurridas las primeras horas después de una lesión en el SNC, las primeras células en llegar a la zona lesionada son los macrófagos provenientes del torrente sanguíneo; y la microglía que migra desde el tejido que rodea la zona lesionada. Pasados de 3 a 5 días son reclutados un gran número de precursores de oligodendrocitos (Fawcett and Asher, 1999) y, finalmente, la zona lesionada queda dominada por los astrocitos que, primeramente, pasaran por una fase reactiva, que incluye la proliferación de los mismos en la zona que rodea el centro de la lesión, y se caracteriza por una hipertrofia como

consecuencia de la sobreexpresión de filamentos intermedios como la Vimentina y la *glial fibrillary acidic protein (GFAP)* (Eng et al., 1987).

La formación de una cicatriz glial mecánicamente obstructiva compuesta de astrocitos y elementos del tejido conectivo se utilizó durante un tiempo como explicación del fallo de la regeneración después de lesión (Windle and Chambers, 1950).

Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que la cicatriz glial está lejos de ser únicamente una barrera física ya que la prevención de la regeneración por parte de las células gliales implica además complejas interacciones celulares y moleculares (Fitch and Silver, 2008). El efecto inhibitorio del tejido cicatrizado está considerado como uno de los principales

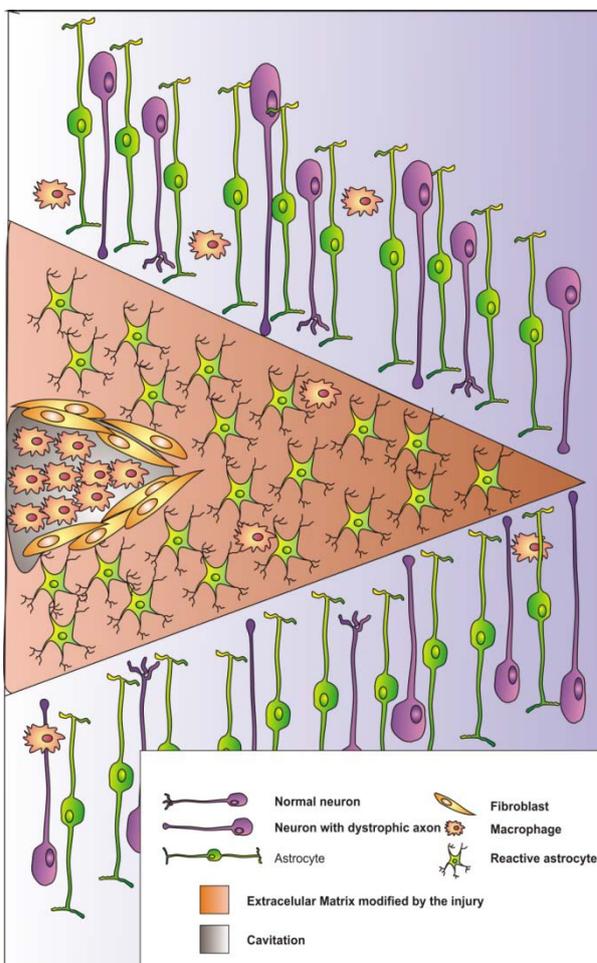


Figura 3. Composición esquemática de la cicatriz glial.

obstáculos para la regeneración, pero sólo explicaría de forma parcial la falta de efectividad en la recuperación del SNC (Figura 3)

La función de la cicatriz glial es el aislamiento de la zona lesionada del resto de tejido, posiblemente para prevenir la extensión del daño a otras regiones. El efecto indeseado del sellado de la lesión del resto de axones intactos, es que dichos axones son incapaces de atravesarlo. Pero más importante es el hecho de que la cicatriz glial por sí misma es capaz de producir un importante número de factores que hacen del medio que rodea la zona de lesión una zona perjudicial para los axones en regeneración.

Entre estos factores se incluyen la Tenascina, Semaforinas secretables, Efrinas y numerosos proteoglicanos

condroitín sulfatos (CSPG) (Fitch and Silver, 2008). Contrariamente, algunos artículos y estudios señalan que este “sellado” podría tener en realidad posible papel en la respuesta protectora. En este sentido, estudios realizados por diversos grupos independientes demuestran que la eliminación de los astrocitos de la zona de lesión conduce a lesiones más extensas, desmielinizaciones severas y muerte de neuronas de la región CA1 del hipocampo y oligodendrocitos (Bush et al., 1999, Faulkner et al., 2004).

En referencia a esta dualidad, no podemos tampoco dejar de lado el papel del sistema inmune. Numerosos estudios sugieren que la respuesta inmune aceleraría el daño tisular o bien sería por sí misma la causa inicial del daño en la zona lesionada.

Pero cada vez más, existen nuevas evidencias de que el tejido nervioso podría beneficiarse de la respuesta inmune si ésta está bien regulada tanto funcional, espacial como temporalmente (Schwartz et al., 2006, Garg et al., 2008, Garg et al., 2009). Directamente esta regulación dependerá de los diferentes estímulos procedentes de la cicatriz glial.

Así, por ejemplo, mientras los astrocitos están mayoritariamente asociados con el control del número de células infiltradas a través de la síntesis de moléculas inmuno-moduladoras como el *transforming growth factor- β* (*TGF β*) o *tumor necrosis factor- α* (*TNF α*) (Chung and Benveniste, 1990, Faulkner et al., 2004); los CSPGs principalmente participan la localización espacial y su activación (Shearer et al., 2003, Nandini and Sugahara, 2006). (Figura 3)

Por otro lado, muy recientemente se ha visto que un específico subtipo de pericitos participaría en la formación de la cicatriz glial y que superarían en número a la población astrocitaria en medula espinal lesionada. Así, dicho estudio parece demostrar que el bloqueo de la generación de esta progenie de pericitos resultaría en un fallo en la formación del “sellado” propio del tejido lesionado (Goritz et al., 2011) favoreciéndose así una posible regeneración axonal.

1.1.2. Proteínas inhibitorias no asociadas a la mielina.

En la cicatriz glial se expresan a niveles elevados una gran cantidad de moléculas inhibitorias. Los proteoglicanos condroitin sulfato (CSPG, del inglés *chondroitin sulfate proteoglycan*), producidos mayoritariamente por los astrocitos reactivos, son los más altamente expresados, aunque en la mayoría de lesiones también se produce la expresión y sobreexpresión de gran cantidad y variedad de moléculas de guía axonal como Semaforinas (Giger et al., 2010), Netrinas (Low et al., 2008a), Efrinas (Rolls et al., 2009) y Slits (Hagino et al., 2003) que poseen un importante efecto inhibitor del crecimiento neurítico. A continuación a forma de sumario, se describe el papel de estas moléculas en el SNC y en la regeneración axonal.

- a) **Proteoglicanos.** Los proteoglicanos son glucoproteínas altamente glucosiladas que forman parte de la matriz extracelular y son sintetizadas por astrocitos reactivos, células meníngeas y oligodendrocitos (Pasterkamp and Verhaagen, 2001, Shearer et al., 2003, Silver and Miller, 2004). Los proteoglicanos están compuestos

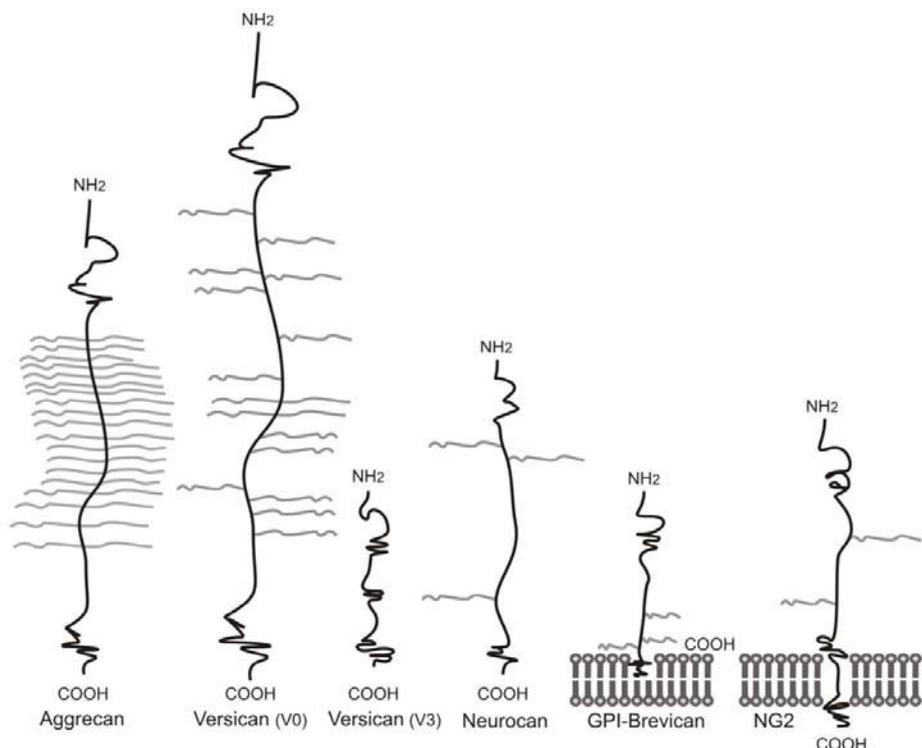


Figura 4. Modelos estructurales de diferentes Proteoglicanos. Las líneas onduladas muestran las cadenas de de condroitín sulfatos. GPI, Glucosil Fosfatidil Inositol *Adaptado de Bandtlow et al. 2000.*

por un núcleo proteico al que se encuentran unidas covalentemente varias cadenas de glucosaminoglucanos (GAG), que en condiciones fisiológicas están cargados negativamente por la presencia de grupos sulfato o ácido urónico (D-glucurónico o L-idurónico). De forma natural los Proteoglucanos están involucrados en numerosos procesos como crecimiento axonal, adhesión, migración e interacción con otros componentes de la matriz extracelular. Los astrocitos producen varios tipos de proteoglucanos con actividad inhibitoria, la Tenascina (Meiners et al., 1995) y los proteoglucanos condroitin sulfato (CSPG, del inglés *chondroitin sulfate proteoglycan*) son dos de ellos (McKeon et al., 1991, McKeon et al., 1999).

La familia de CSPG consta de moléculas secretables (Neurocan, Fosfacan), moléculas ancladas a la membrana mediante un dominio GPI (Brevican) y moléculas transmembrana (NG2) (Sandvig et al., 2004, Kwok et al., 2008) (Figura 4). Durante el desarrollo del SNC, los CSPG participan en la modulación de migración neuronal y guía axonal, en el crecimiento neurítico (tanto promoviendo como inhibiéndolo) y en la regulación de la polaridad neuronal (Bovolenta and Fernaud-Espinosa, 2000). Su efecto sobre el crecimiento neurítico depende del tipo celular con el que interaccionan, de su concentración y de su interacción con otras moléculas (Bovolenta and Fernaud-Espinosa, 2000). En cultivo, los CSPG resultan extremadamente inhibitorios para axones embrionarios de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG), y actúan como potentes inhibidores de diversos promotores del crecimiento, como L1 o Fibronectina (Sandvig et al., 2004). En mamíferos adultos, y en distintos tipos de lesión del SNC, los CSPG son producidos y secretados rápidamente tras lesión (durante las primeras 24 horas) y persisten durante meses produciendo la inhibición axonal y la repulsión del cono de crecimiento (Carulli et al., 2005). Gran parte del efecto repulsivo proviene de las cadenas de GAG, ya que la actividad inhibitoria de los CSPG disminuye tras la aplicación de condroitinasa ABC, una enzima bacteriana que elimina las cadenas de GAG (Kwok et al., 2008). Sin embargo, existen datos que sugieren que el núcleo

proteico también puede provocar inhibición independiente de las cadenas GAG (Sandvig et al., 2004).

Hasta el momento, el conocimiento acerca de los receptores y de la señalización intracelular que desencadenan los CSPG era escaso, aunque se ha implicado a la familia de enzimas GTPasas monoéricas Rho (Monnier et al., 2003) y también algunas isoformas de la *protein kinase C (PKC)* en su señalización (Sivasankaran et al., 2004). Y más recientemente se ha descubierto que el receptor de proteína tirosina fosfatasa sigma (RPTP σ) actúa como receptor de los CSPGs (Duan and Giger, 2010). Al exponer neuronas de DRG de animales *knockout* para el receptor a los CSPGs, el efecto inhibitorio era revertido (Shen et al., 2009, Duan and Giger, 2010).

- b) **Semaforinas.** Después de las etapas más tempranas del desarrollo embrionario, la expresión de numerosas moléculas implicadas en la guía axonal disminuye o se ve alterada mientras que otras mantienen los niveles de expresión embrionarios y están presentes en abundancia en el cerebro maduro y en la médula espinal. La expresión de esas moléculas en el adulto implica nuevos roles para ellas más allá del proceso de crecimiento neuronal, direccionamiento del cono de crecimiento y la consiguiente invasión con las dianas. Algunas de las nuevas funciones descritas incluyen procesos de refinamiento de conexiones (Bagri et al., 2003, Low et al., 2008b, Xu and Henkemeyer, 2009) y regulación de la excitabilidad y actividad sináptica neuronal del SNC maduro (Klein, 2009, Pasterkamp and Giger, 2009). En el caso de daño neuronal estas moléculas sufren una remarcable sobreexpresión por parte de las células meníngicas o oligodendrocitos en las zonas que rodean la lesión, involucrándolas directamente en el complejo entramado de la inhibición de la regeneración (Giger et al., 2010).

Las **semaforinas** son uno de los ejemplos de factor guía que más atención ha recibido en cuanto a su posible función en la regeneración axonal del sistema nervioso. La Semaforina3A (Sema3A), semaforina de clase 3, secretable, es expresada por las células meníngicas y fibroblastos en la cicatriz glial (Pasterkamp et al., 1999) y algunos estudios actuales indican que su actividad inhibitoria se podría ver

incrementada por la cicatriz glial de una manera CSPG-dependiente (Pasterkamp and Verhaagen, 2006). En el año 2003 en un estudio de Kikuchi y colaboradores se descubrió un inhibidor (SM-216289) que bloqueaba la unión de la Sema3A a su complejo receptor neuropilina-1/plexinaA atenuando de esta manera la repulsión que ésta causaba *in vitro* sobre neuronas DRG (Kikuchi et al., 2003). Además también se ha demostrado que el inhibidor es útil *in vivo* y que produce crecimiento de los axones serotoninérgicos que expresan neuropilina-1 después de lesión de médula espinal en ratas pero no así en los axones corticospinales o los sensoriales ascendentes (Kaneko et al., 2006). En el caso de lesión de la vía entorhino-hipocámpica (EHP) en cultivos organotípicos, el bloqueo de la Sema3A con un peptido (SICHI) da lugar al crecimiento de axones en el hipocampo (Montolio et al., 2009). Tomados conjuntamente estos resultados respaldan la idea de que la Sema3A inhibe el crecimiento regenerativo de los axones tanto *in vitro* como *in vivo*.

Además de las semaforinas de clase 3, las semaforinas asociadas a membrana sintetizadas por oligodendroglia contribuyen también al fallo de regeneración de axones lesionados en el SNC. La Sema4D, expresada por oligodendrocitos y transitoriamente sobreexpresada en las proximidades de la lesión en el caso de daño en medula espinal, inhibe el crecimiento de neuritas postnatales cerebelares y sensoriales *in vitro* (Moreau-Fauvarque et al., 2003). De manera similar, la Sema7A es expresada por oligodendrocitos en la sustancia blanca de la medula espinal (Pasterkamp et al., 2007) y la Sema6B se sobreexpresa enormemente cerca del lugar de la lesión después de transección en rata adulta (Kury et al., 2004). En el nervio óptico la Sema5A se expresa en oligodendrocitos antes y después de axotomía, produce el colapso y la inhibición del crecimiento de axones retinales (Goldberg et al., 2004).

- c) **Netrinas.** Las netrinas son una familia de proteínas secretables relacionadas con la guía axonal en la línea media. La Netrina-1 es el miembro que da nombre a la familia, es un ligando bifuncional que tiene tanto la capacidad de atraer como de repeler axones. Así, mientras el receptor *Deleted in Colorectal Cancer (DCC)* media la

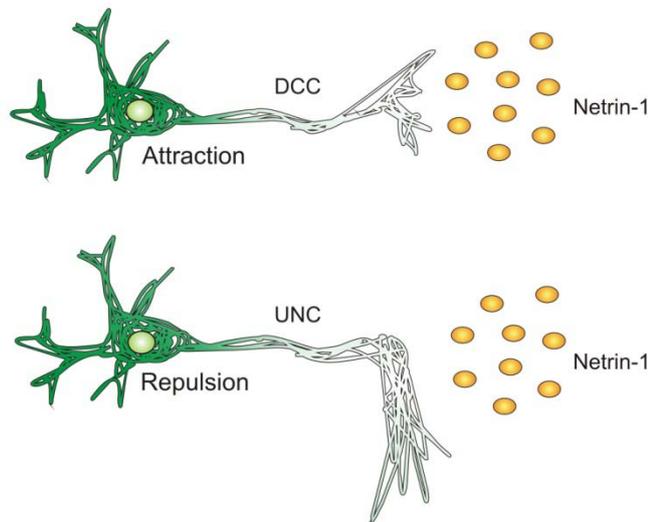


Figura 5. Efecto de la Netrina-1 en atracción y repulsión.

atracción de axones a través de la Netrina-1 (Tessier-Lavigne et al., 1988, Serafini et al., 1996, Finger et al., 2002), los receptores de la familia *Uncoordinated 5* (UNC5) están implicados en la repulsión frente a Netrina-1 (Hedgecock

et al., 1990, Leonardo et al., 1997) (Figura 5). La repulsión mediada por netrina-1 no solo requiere de la expresión en el axón de un receptor UNC5 si no que en muchos casos también requiere de la formación de un complejo receptor entre DCC y UNC5 (Hedgecock et al., 1990, Hong et al., 1999). El hecho de que la Netrina-1 sea expresada por los oligodendrocitos maduros en la médula espinal en adulto (Manitt et al., 2001), que se haya descrito con anterioridad que los oligodendrocitos son una fuente de proteínas inhibitorias asociadas a mielina como Nogo-A (Chen et al., 2000, GrandPre et al., 2000), *myelin-associated glycoprotein* (MAG) (McKerracher et al., 1994) y *oligodendrocyte myelin glycoprotein* (OMgp) (Wang et al., 2002b) y que los oligodendrocitos además expresen moléculas de guía repulsivas como la semaforina4D (Moreau-Fauvarque et al., 2003) y la ephrinaB3 (Benson et al., 2005), alentó algunos científicos a determinar si la Netrina-1 podía estar involucrada en la regeneración axonal. Tuszynski y colaboradores recientemente proporcionaron evidencias funcionales de que efectivamente la Netrina-1 es un inhibidor de la regeneración axonal asociado a oligodendrocitos en medula espinal (Low et al., 2008a).

- d) **Efrinas.** Las **Efrinas**, y sus receptores, conocidas por su implicación en migración celular y guía axonal durante el desarrollo, también son sobreexpresadas en la zona de lesión (Bundesen et al., 2003). Así, Efrina-2 y su receptor EphB2 se expresan en fibroblastos meníngeos y

astrocitos reactivos respectivamente sugiriendo que estas moléculas pueden ser importantes en la formación de la cicatriz (Bundesen et al., 2003, Sandvig et al., 2004, Rolls et al., 2009).

Estos fibroblastos derivados de las meninges, además de producir estas moléculas inhibitorias también constituyen parte de la barrera física. De hecho, algunos estudios sugieren que, más que la barrera física que forman los astrocitos en la cicatriz glial, es el límite celular astrocito/meníngeo el que impide a los axones cruzar dicha barrera (Shearer and Fawcett, 2001, Shearer et al., 2003, Sandvig et al., 2004).

Otra de las efrinas implicada en regeneración y plasticidad sináptica es la Efrina-B3, expresada en oligodendrocitos y considerada como un miembro más de las proteínas inhibitorias asociadas a la mielina (MAIs, del inglés *myelin-associated inhibitors*)(Benson et al., 2005, Liu et al., 2006c).

- e) **Slits**. Son proteínas difusibles que participan en múltiples aspectos del desarrollo neural, como es la guía axonal (Brose et al., 1999, Plump et al., 2002) y la migración neuronal (Marin et al., 2003, Lopez-Bendito et al., 2007). En el adulto los miembros de la familia Slit y el receptor Robo-2 son expresados en regiones como la corteza cerebral, hipocampo y septum (Marillat et al., 2002, Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004). De manera similar a las Efrinas, se ha descrito la expresión de todos los miembros de la familia Slit y de su receptor en la zona de lesión en el SNC. De todos ellos, Slit2 muestra la expresión más intensa, localizada en astrocitos reactivos que rodean el tejido necrótico, lo que sugiere que Slits podrían formar parte del ambiente inhibitorio creado en la zona lesionada (Hagino et al., 2003). Recientemente se han descrito una serie de nuevos inhibidores que bloquean la interacción entre las proteínas Slit y uno de sus receptores de alta afinidad, y que podrían tener un prometedor perfil terapéutico en lesiones de medula espinal (Lau and Margolis, 2010).

1.1.3. Proteínas Asociadas a la Mielina

Debido a que las MAIs y sus receptores serán tratados en detalle en el capítulo II de la introducción, este apartado será un breve resumen introductorio a este conjunto de proteínas y sus receptores.

Debemos recordar que incluso en ausencia de una lesión, el SNC de adulto es muy desfavorable para el crecimiento axonal. Esta inhibición es en gran parte debida a la presencia de moléculas inhibitoras que están directamente asociadas con la mielina (Grados-Munro and Fournier, 2003). Las principales proteínas que se encuentran en esta categoría son la *myelin-associated glycoprotein* (MAG), Nogo-A y *oligodendrocyte myelin glycoprotein* (OMgp). (Figura 6)

Los trabajos pioneros realizados por el Dr. Schwab proporcionaron la primera evidencia de que la gran capacidad inhibitoria de la mielina dependía de la presencia de una serie de proteínas presentes en ella (Caroni and Schwab, 1988b). El grupo del Dr. Schwab generó un anticuerpo monoclonal llamado IN-1 contra moléculas presentes en la mielina cuyo efecto sobre la inhibición del

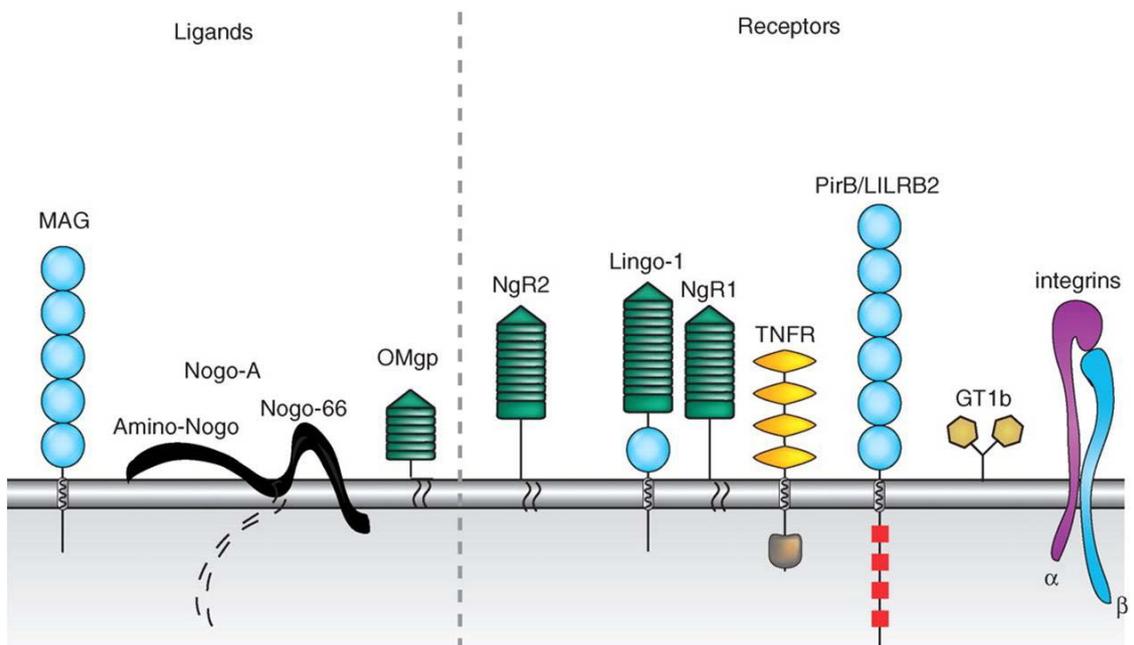


Figura 6, Inhibidores asociados a la mielina (MAIs), Nogo-A, MAG, OMgp y sus receptores. Muestra de la variabilidad en la topología inhibitoria de Nogo-A, su región Amino terminal se ha encontrado tanto extra como intracelularmente. Dos de los receptores de unión a las MAIs más importantes son PirB y NgR1. NgR1 forma parte de un complejo receptor compuesto por Lingo-1 y miembros de la familia de los TNFR (p75 o TROY). La isoforma NgR2 de unión específica a MAG, los gangliósidos, como GT1b, y las integrinas también forman parte del complejo entramado de receptores que participan en la inhibición del crecimiento neuronal. *Adaptado de Giger et al. 2010.*

crecimiento axonal era desconocido (Caroni and Schwab, 1988a). Con este anticuerpo Schwab y colaboradores conseguían bloquear, en parte, el efecto inhibitorio de la mielina. El clonaje del epítipo reconocido por el IN-1 condujo a la identificación de la primera proteína inhibitoria asociada a la mielina, Nogo-A (Caroni and Schwab, 1988b, a). Poco después de este descubrimiento, las proteínas MAG (McKerracher et al., 1994) (conocida previamente por su implicación en la formación de la vaina de mielina) y la OMgp (Wang et al., 2002b) fueron también identificadas como proteínas inhibitorias asociadas a la mielina. A pesar de sus diferencias estructurales estas proteínas se unían a un mismo complejo receptor para desencadenar el efecto inhibitorio. Este complejo receptor está integrado por la proteína Nogo Receptor (NgR1) (que da el nombre a todo el complejo receptor) y que se une a los tres ligandos, al correceptor Lingo-1 y a uno de los dos receptores de la familia de los receptores de muerte celular, p75 o Troy (Wang et al., 2002a, Mi et al., 2004, Park et al., 2005, Shao et al., 2005). Además de estos receptores y/o correceptores se han descrito nuevos receptores para las MAIs, como integrinas, gangliósidos o el *paired immunoglobuline-like receptor B* (PirB) (Figura 6). La interacción de los tres ligandos alguno de sus receptores, desencadena una compleja respuesta intracelular celular, desconocida en gran parte, que da lugar a la inhibición del crecimiento axonal.

Diferentes estudios han demostrado que NgR, Nogo-A, OMgp y MAG están regulados después de lesión (Hunt et al., 2002a, Meier et al., 2003, Mingorance et al., 2004, Mingorance et al., 2005, Seira et al., 2010); esta regulación es rápida y no está restringida a la cicatriz glial, por tanto las MAIs se consideran como una de las principales familias de moléculas en cuanto a la prevención de la regeneración axonal fuera de la cicatriz glial, prácticamente antes de su aparición.

1.2. Plasticidad después de lesión/potencial neuronal para la regeneración en el Sistema Nervioso Central

A pesar de las afirmaciones iniciales de que los axones en el SNC adulto eran incapaces de regenerar, diferentes investigaciones han contribuido a demostrar que los axones del SNC tienen preservada la capacidad de regenerar en la edad adulta. Actualmente está claro que la reorganización estructural inducida por lesión o **plasticidad** en el SNC adulto puede tener lugar de manera prolongada lo que podría parcialmente contribuir a la recuperación funcional tras lesión. El proceso de plasticidad consiste en cambios en los patrones de activación tanto estructural como funcional que implican una alteración de la fuerza/*strength* de las conexiones ya existentes y la formación de nuevas conexiones neurales. En numerosos y diferentes modelos experimentales se ha observado *sprouting* o reorganización neuronal (Liu and Chambers, 1958, Guth et al., 1985) e incluso *sprouting* de corta distancia de los axones que sobreviven dentro de la zona de lesión (Li and Raisman, 1994, Freund et al., 2006, Taylor et al., 2006) (Figura 7). Sin embargo, en la zona lesionada los conos de crecimiento que se forman se convierten en distróficos rápidamente. A pesar de ello, estos conos de crecimiento distróficos son actualmente estructuras muy dinámicas con un *turnover* o recambio de componentes de membrana tanto *in vitro* como *in vivo* en los que se repiten episodios de endocitosis y sucesivos intentos de emisión de *membrane veils* (Tom et al., 2004, Kerschensteiner et al., 2005). El fracaso en el crecimiento de estos conos de crecimiento distróficos está directamente relacionado con la naturaleza inhibitoria y no permisiva del cerebro y medula espinal lesionados. Además, se requieren otras muchas condiciones para conseguir que la regeneración axonal sea satisfactoria. En primer lugar el soma neuronal debe sobrevivir a la lesión; después, los axones lesionados deben ser capaces de formar un nuevo cono de crecimiento funcional, alcanzar su diana original y hacer sinapsis con ella, y finalmente, la nueva conexión debe ser remielinizada.

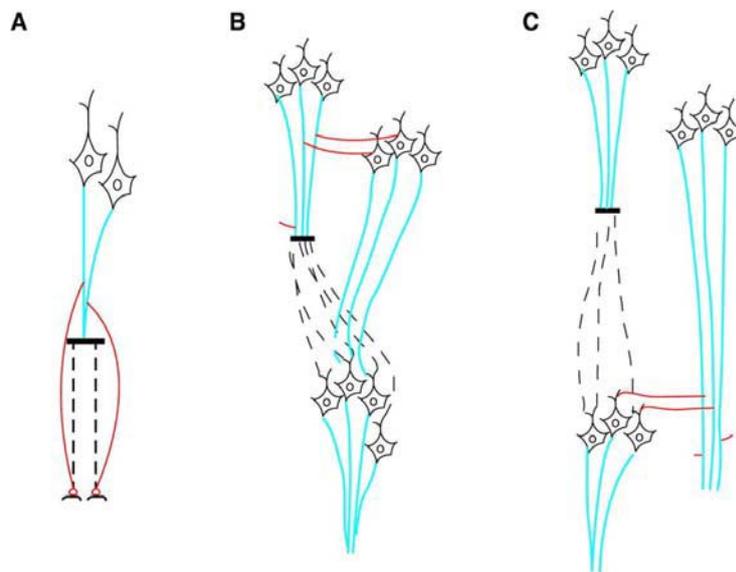


Figura 7. Estrategias para el restablecimiento de la innervación neuronal después de lesión. A) Regeneración de larga distancia (SNP). B) Crecimiento axonal de corta distancia (SNC). C) *Sprouting* axonal para el mantenimiento de la conectividad. Las líneas punteadas representan los axones en proceso de degeneración Walleriana y las rojas los nuevos axones formados. *Adaptado de Taylor et al. 2006.*

1.3. Modelos de lesión y estrategias para la regeneración

En el camino para conseguir el desarrollo de nuevas terapias o tratamientos para conseguir la regeneración del SN, encontramos en primer lugar con la necesidad de buscar los modelos de lesión que mejor simulen las situaciones de daño reales para posteriormente poder realizar el salto traslacional a la clínica humana; y en segundo lugar la búsqueda de estrategias que intenten mejorar la capacidad de regeneración del tejido dañado.

1.3.1. Modelos de lesión

Existen diferentes causas de daño en el SNC, pero generalmente para el estudio de la regeneración axonal en modelos animales se utilizan dos tipos de lesión. Estos dos tipos de lesión se diferencian entre sí en la región que se ve afectada, de esta manera podemos diferenciar: Lesión de la medula espinal (SCI, del inglés *Spinal Cord Injury*) o Lesión traumática Cerebral (TBI, del inglés *Traumatic Brain Injury*).

A parte de esta diferencia regional existen dos modelos, que pueden ser aplicados en ambos tipos de lesión, que son: el modelo de Transección y el modelo de Contusión.

La **transección** o axotomía utiliza una transección quirúrgica de un tracto nervioso. En el caso de la médula espinal esta puede ser parcial (hemisección) o completa y en el caso del cerebro sería una axotomía unilateral o bilateral. Por el contrario, la **contusión** es producida por la liberación desde una determinada altura de una varilla de peso conocido sobre la zona a lesionar en el caso de SCI.

De los dos modelos, el modelo de contusión es el que más simula una lesión medular típicamente humana y cerebral y este hecho lo hace ser mejor para realizar estudios en humanos. Por el contrario el modelo de transección, mucho más selectivo, permite la selección de un mayor número de parámetros y por ello es más apropiado para la investigación más básica (Hyun and Kim, 2010).

El modelo utilizado en esta tesis es la axotomía de la vía perforante, modelo de transección unilateral dentro del conjunto de TBIs. La vía perforante es la principal conexión aferente al hipocampo, y conecta la corteza entorrinal con las células granulares del giro dentado, todas las capas de la CA y el subículo. Para mayor detalle del modelo ver trabajos anteriores el grupo (Mingorance et al., 2004, Mingorance et al., 2006, del Rio and Soriano, 2010).

1.3.2. Aproximaciones experimentales para la promoción de la regeneración

Como ya hemos dicho anteriormente, existen un gran número de factores en la zona lesionada que formarán parte de la barrera física y bioquímica inducida por la lesión y que incluirán las moléculas inhibitorias presentes en la melina así como la presencia de las células gliales y las moléculas sintetizadas por ellas mismas.

Lógicamente, las principales investigaciones sobre regeneración neuronal aspiran a conseguir superar los factores involucrados en bloqueo de dicha regeneración. De manera más específica, estas investigaciones siguen una serie de objetivos más o menos establecidos:

a) Evitar lesiones secundarias

Las lesiones secundarias suelen aparecer mayoritariamente durante las primeras horas o días después tras la lesión primaria u original. El resultado final de la lesión secundaria es la expansión del tamaño de la lesión debido a alteraciones locales en la concentración de iones (Kwo et al., 1989); pérdida local y sistémica de la presión sanguínea (Tator and Fehlings, 1991, Krassioukov and Claydon, 2006), reducción del flujo sanguíneo (sobre todo en caso de medula espinal) (Tator and Fehlings, 1991), deterioro o rotura de la barrera hematoencefálica (Tator and Fehlings, 1991, Webb and Muir, 2000, Krassioukov and Claydon, 2006); producción de radicales libres (Juurlink and Paterson, 1998), el desequilibrio de las metaloproteinasas activas (Yong et al., 1998, Levine et al., 2006) y la liberación de neurotransmisores citotóxicos (Olby et al., 1999, Park et al., 2004). Por último el resultado conjunto de la lesión primaria y posteriormente la secundaria conduce al bloqueo de impulsos nerviosos que dará como resultado la desmielinización, isquemia, necrosis y apoptosis del tejido.

Con el fin de evitar todas esas alteraciones, se han llevado a cabo diferentes investigaciones entre las que figuran: la administración de drogas inmunomoduladoras, como al minociclina, o antibióticos contra moléculas de adhesión leucocitaria con el fin de modular la neuroinflamación (Popovich et al., 1999, Wells et al., 2003, Gris et al., 2004, Schwartz and Yoles, 2006); administración de glucocorticoides, quelantes iónicos y promotores del glutatión con el fin de reducir el daño producido por los radicales libres (Hall and Braugher, 1982, Juurlink and Paterson, 1998, Schultke et al., 2003, Golding et al., 2006, Liu-Snyder et al., 2007); la administración antagonistas del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) para la reducción de daño excitotóxico a las neuronas (Hirbec et al., 2001); mejorar el flujo sanguíneo mediante la administración de antagonistas opiáceos o bloqueantes de los canales de calcio

(Faden et al., 1981), el sellado de las membranas dañadas administrando surfactantes de forma sistémica (Luo et al., 2002, Laverty et al., 2004) y por último contrarrestar los efectos de los desequilibrios iónicos mediante la administración de bloqueantes de canales de sodio y calcio (Winkler et al., 2003, Hains et al., 2004, Kaptanoglu et al., 2005, Nehrt et al., 2007). Hasta el momento, ninguno de los tratamientos ha sido de gran utilidad para el tratamiento de la lesión.

b) Favorecer la regeneración y/o *sprouting* de los axones supervivientes

Animales *knockout*. Se han llevado a cabo numerosos estudios genéticos con ratones para esclarecer de manera definitiva el papel de las proteínas inhibitorias asociadas a mielina en la regeneración axonal (Zheng et al., 2006). Sin embargo, en muchos casos no se han obtenido los resultados esperados. De este modo en el caso de ratones carentes de Nogo-A y Nogo-B o ambos, no se observa una regeneración robusta ni consistente (Kim et al., 2003, Zheng et al., 2003, Zheng et al., 2005, Dimou et al., 2006, Cafferty et al., 2007a, Steward et al., 2007); por el contrario se ha observado regeneración de axones del nervio óptico lesionados en animales *knockout* para los tres miembros de la familia de Nogo (Nogo-A/B/C) (Su et al., 2008). En animales *knockout* para OMgp también se ha observado un incremento, que posiblemente sea debido a un proceso de *sprouting* (Ji et al., 2008), en que el crecimiento axonal es dependiente del *background* o fondo genético de los animales utilizados (Ji et al., 2008). En el caso de la proteína MAG, los estudios genéticos no han otorgado un papel muy significativo en el crecimiento axonal inducido después de lesión (Bartsch et al., 1995).

Estas observaciones, junto con el hecho de que las tres proteínas desencadenan su mayor cascada de señalización a través de un mismo receptor común, han llevado a los investigadores a desarrollar

la hipótesis de que MAG, Nogo y OMgp juegan papeles redundantes en la restricción de la regeneración axonal (Filbin, 2003, Liu et al., 2006a, Zheng et al., 2006). Incluso estudios muy recientes sugieren que a pesar de que estas tres proteínas modulan, ligeramente, el *sprouting* axonal en medula espinal lesionada, no juegan un papel central en el fallo de la regeneración axonal en el SNC lesionado ya que no se produce regeneración ni una mejora significativa en los test de comportamiento (Lee et al., 2010).

Bloqueo con anticuerpos. Otra estrategia alternativa es el uso de anticuerpos para bloquear la interacción de las proteínas con sus receptores. Durante muchos años y antes de la caracterización de la proteína Nogo-A, el anticuerpo monoclonal IN-1 fue utilizado para neutralizar los efectos inhibitorios de la mielina en diversos estudios *in vitro* e *in vivo* (Schnell and Schwab, 1990, Cadelli and Schwab, 1991, Brosamle et al., 2000, Raineteau et al., 2001, Papadopoulos et al., 2002, Tatagiba et al., 2002). El IN-1 reconoce el dominio N-Terminal (Amino-Nogo) (Fiedler et al., 2002, Hu and Strittmatter, 2008), dominio que ejerce los efectos inhibitorios a través de su interacción con ciertas integrinas (Hu and Strittmatter, 2008). Además del anticuerpo IN-1, otros anticuerpos contra MAG y un anticuerpo monoclonal contra NgR1 también reducen la inhibición inducida por mielina *in vitro* promoviendo el crecimiento neurítico sobre mielina o un sustrato de MAG (Mukhopadhyay et al., 1994, Li et al., 2004c). Otros ejemplos son también el uso de anticuerpos contra semaforinas como la Semaforina 7A, Semaforina 3A y 5A en células ganglionares de la retina (RGC, del inglés *retinal ganglion cells*) sobre las que producen un incremento del crecimiento axonal de mismas frente a la exposición a dichas semaforinas (Huber et al., 2003, Su et al., 2008)

Antagonistas y otras estrategias. Algunas de las posibles alternativas al uso de anticuerpos para el bloqueo de las interacciones ligando/receptor es el uso de proteínas recombinantes

incluyendo péptidos, peptoides (péptidos sintéticos), dominantes negativos o bien ectodominios. Uno de los más exitosos péptidos antagonistas utilizado para promover la regeneración *in vivo* e *in vitro* después de SCI o post axotomía es el péptido NEP1-40 (*Nogo Extracellular Peptide, residues 1-40*), formado por los primeros 40 residuos del *loop* Nogo-66 (dominio de Nogo-A que interacciona con NgR1) y que actúa como un antagonista competitivo del NgR1 impidiendo la unión de Nogo-66 pero no de otras proteínas como MAG y OMgp (GrandPre et al., 2002, Li et al., 2004a). Uno de los mayores problemas del uso de péptidos con fines terapéuticos es que la liberación de los mismos al parénquima cerebral es bastante limitado debido, en muchos casos, a su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Recientemente se ha generado una versión mejorada del péptido **NEP1-40** fusionándolo con el dominio de transducción proteica del transactivador de la transcripción (TAT). **TAT-NEP1-40** es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica *in vivo* (Gou et al., 2011). Otro ejemplo, en este caso de **peptoide** que actúa sobre moléculas inhibitorias no asociadas a la mielina es el **SICHI**, que de manera selectiva previene la unión de Sema3A a la neuropilina 1 (NP1). Este peptoide incrementa la regeneración de axones entorrinales lesionados en el modelo *in vitro* de cultivo organotípico (Montolio et al., 2009). Los péptidos y peptoides son limitados por el simple hecho de que suelen afectar una única molécula inhibitoria, por eso se han intentado desarrollar nuevas estrategias que conduzcan a un bloqueo generalizado del efecto inhibitorio. Algunos ejemplos específicos que podemos encontrar son: uso del **ectodominio NgR(310)**, fragmento soluble del receptor de Nogo que carece de la capacidad de unión con sus correceptores, su administración en ratas con SCI induce *sprouting* de las fibras del tracto corticoespinal (CST, del inglés *corticospinal tract*) (Li et al., 2004b). Utilización del **NgR^{OMNI}-Fc**, sintetizado en base al estudio de las interacciones entre MAG y el NgR1 y que posee una mayor capacidad de unión a las MAIs y que promoverá el crecimiento neurítico de las CGNs sobre diferentes sustratos inhibitorios (Robak

et al., 2009). En esta misma línea estratégica, destacan diferentes estudios en los que la síntesis de nuevas formas solubles truncadas, **sNgR** (MacDermid et al., 2004) y **NgSR** (Peng et al., 2010); la síntesis de **anticuerpos anti-NgR** mediante inmunización con proteínas NgR recombinantes (Yu et al., 2008a) y por último, de manera similar al ectodominio, la construcción de **dominantes negativos** como el **dnNgR**, capaz de mantenerse anclado a la membrana y competir con el receptor original por la interacción con los ligandos inhibitorios; dan lugar a recuperación estructural y funcional después de lesión (Domeniconi et al., 2002, Fischer et al., 2004).

Degradación enzimática. Algunas proteínas requieren la presencia de dominios o residuos específicos que generalmente están involucrados en la interacción ligando/receptor. Este es el caso de MAG que induce la inhibición del crecimiento axonal a través de la unión de NgR, NgR2 y los gangliósidos (Chen et al., 2006). Mientras que la unión con NgR parece ser ácido siálico independiente la unión con Ng2 y los gangliósidos es revertida mediante un tratamiento con **neuraminidasa (NANasa)**. La NANasa libera los ácidos siálicos de la superficie neuronal reduciendo la inhibición mediada por MAG *in vitro* (DeBellard et al., 1996, Tang et al., 1997a, Tang et al., 2001, Mingorance et al., 2005). El problema es la gran inespecificidad del tratamiento. Por otro lado, otro obstáculo inhibitorio es la cicatriz glial. Como ya hemos explicado con anterioridad, después de lesión se produce una sobreexpresión de los CSPGs compuestos por los GAG. La degradación por la enzima bacteriana **condroitinasa ABC (ChABC)** permite al tejido del SNC su regeneración *in vitro* (Rhodes and Fawcett, 2004, Mingorance et al., 2006). La aplicación de esta enzima también ha tenido efectos beneficiosos en situaciones *in vivo* pero los resultados de regeneración han dado lugar a resultados de recuperación comportacional un poco dispares (Bradbury et al., 2002, Barritt et al., 2006, Cafferty et al., 2007b, Garcia-Alias et al., 2009).

Señalización intracelular. Otra de las aproximaciones que ha intentado reducir el efecto de las moléculas inhibitorias, es la modificación de las proteínas y quinasas implicadas en la señalización intracelular. Una de ellas es el **cAMP**, sus niveles de expresión controlan diversos procesos relacionados con el incremento de la capacidad regenerativa neuronal (dinámica del citoesqueleto y transcripción proteica). Diferentes estímulos con neurotrofinas producen un incremento de los niveles de cAMP, lo que conlleva a la activación de las quinasas PKA y CREB, que finalmente regularán la Arginasa I (ArgI) produciéndose el bloqueo de la inhibición inducida por la mielina y MAG (Cai et al., 2002, Neumann et al., 2002, Gao et al., 2003, Gao et al., 2004). Por tanto, el incremento de los niveles de cAMP puede reforzar la vía y más si este incremento se complementa con otros tratamientos como por ejemplo, el uso de *olfactory ensheathing cells* (OECs) en lesión del tracto cervical rubroespinal (Bretzner et al., 2010) o de células de Schwann en SCI (Pearse et al., 2004); en combinación con la condroitinasa ABC en SNP (Udina et al., 2010) o junto con otro nucleótido cíclico (cGMP) como se ha descrito recientemente (Murray et al., 2009).

Otras de las moléculas que parecen ser claves son las relacionadas con el control y modificación del citoesqueleto. De las muchas proteínas involucradas, las que parecen haber tomado una mayor relevancia en el control de la regeneración son las pertenecientes a la familia de las Rho GTPasas, como es **RhoA** (Niederost et al., 2002). El uso de diferentes inhibidores, como la **TAT-C3 transferasa** o el inhibidor **Y27632**, que evitan o disminuyen el grado de activación de la misma mediante inhibición de su quinasa **ROCK**, da lugar a una mejora en la regeneración axonal después de lesión (Fournier et al., 2003, Tan et al., 2007, Boato et al., 2010). Además también se han y se están llevando a cabo estudios de inhibición de otras quinasas (ej, GSK3 β (Dill et al., 2008, Alabed et al., 2010, Seira et al., 2010). PTEN (Park et al., 2010)) que parecen estar implicadas en la señalización inhibitoria mediante la utilización de inhibidores

específicos. Más adelante veremos en más detalle las funciones de estas proteínas y quinasas.

c) Incremento y mejora de la función decidida para los axones supervivientes

Este punto se refiere principalmente a la actividad física. La actividad física ha estado ligada de manera bastante directa a una mejora en los resultados después de un traumatismo en el SNC. De manera particular se cree que proteínas como factores neurotróficos (BDNF) (Ghiani et al., 2007) o proteínas asociadas al crecimiento como (GAP-43) (Molteni et al., 2004) juegan un papel importante en la plasticidad inducida después de ejercicio, promoviendo así la regeneración y el crecimiento axonal. Gomez-Pinilla et al. demostraron que el ejercicio voluntario incrementaba la expresión de estos dos factores (Gomez-Pinilla et al., 2002) y posteriormente mostraron de forma experimental que ratas con SCI mostraban una mayor recuperación (y regeneración neural) cuando se encontraban en ambientes más enriquecidos o en ambientes en los que podían realizar ejercicios de auto-entrenamiento (Van Meeteren et al., 2003, Engesser-Cesar et al., 2007).

d) Reemplazamiento del tejido destruido (SCI)

Dado que la SCI resulta en procesos de necrosis y apoptosis de diferentes tipos celulares dentro de la médula espinal y que esta pérdida de tejido está, en parte, relacionada con la pérdida de la función sensorimotora, muchos investigadores se han volcado en el intento de reemplazar el tejido perdido para conseguir la recuperación. Los principales estudios realizados son los que incluyen trasplante de células de Schwann (Biernaskie et al., 2007), precursores de oligodendrocitos (Keirstead et al., 2005), células de la glía envolvente olfativa (OECs, del inglés *olfactory ensheathing cells*) (Nash et al., 2002, Ramer et al., 2004) y actualmente investigaciones punteras con el uso de biomateriales biofuncionalizados o bien biomateriales junto con cultivos celulares (Straley et al., 2010, Zurita et al., 2010)

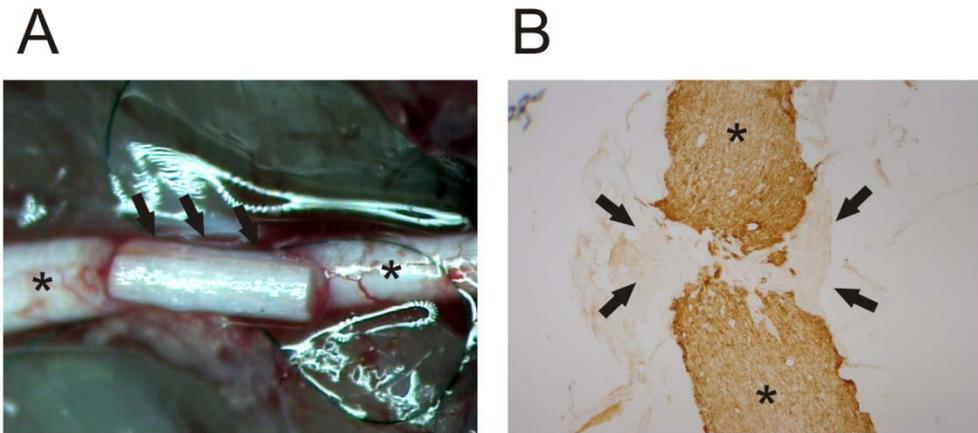


Figura 8. Ejemplos del uso de biomateriales en reparación del tejido nervioso lesionado. A) Nervio ciático de rata seccionado (asteriscos) en el que se implanta el biomaterial (flechas), en este caso el **colágeno seco**. B) Hemisección de médula espinal de ratón (asterisco) con inserción del biomaterial, el ácido poli (láctico-co-glicólico) (**PLGA**)

(Figura 8). Por ejemplo Joo y colaboradores han comprobado como el uso de un *scaffold* de fibra de vidrio-colágeno en animales con lesión torácica completa facilita el crecimiento axonal y produce un efecto beneficioso para la recuperación funcional de los animales en los test de comportamiento (Joo et al., 2012).

INTRODUCCIÓN II

Inhibidores Asociados a la Mielina (MAIs) y Receptores

A pesar del importante número de inhibidores asociados a mielina que están siendo identificados y caracterizados, la verdadera composición de los inhibidores y su relativa contribución al fallo regenerativo de los axones dañados continua siendo en gran parte desconocido. El creciente número de inhibidores y receptores identificados abre grandes posibilidades para el estudio de sus mecanismos de acción sobre la inhibición del crecimiento axonal, además de sus posibles nuevas funciones, por ejemplo en enfermedades neurodegenerativas (Llorens et al., 2011). En este apartado de la introducción se describirán en detalle la estructura molecular, distribución celular y papeles de las principales moléculas asociadas a la mielina y de sus receptores y correceptores. Con respecto a la señalización intracelular de las mismas nos referiremos a ella más en detalle en el Capítulo III.

2.1. Inhibidores Asociados a la Mielina (MAIs)

2.1.1. Nogo-A

Como se ha mencionado anteriormente, experimentos realizados por Caroni y Schwab condujeron a la identificación de moléculas con actividad inhibitoria para el crecimiento axonal en dos fracciones proteicas de la mielina procedente del SNC (Caroni and Schwab, 1988b). Estas fracciones fueron originalmente llamadas, **NI-250** y **NI-35** (del inglés *neurite growth inhibitor* y un número correspondiente a su peso molecular). Generaron un anticuerpo monoclonal, IN-1 (del inglés *inhibition neutralization*) contra la fracción de 250 kDa, capaz de bloquear su acción inhibitoria (Caroni and Schwab, 1988a), y dado que IN-1 también era capaz de neutralizar la actividad inhibitoria de NI-35, se asumió que esta fracción era un producto proteolítico de NI-250 (Bandtlow and Schwab, 2000). Sin embargo, la identidad del antígeno no se conoció hasta

que fue identificado por tres grupos independientes como **Nogo-A** (Chen et al., 2000, GrandPre et al., 2000, Prinjha et al., 2000).

Nogo-A es el transcrito de mayor tamaño del gen *nogo* (también conocido como *RTN4*). Este gen codifica putativamente para siete proteínas por corte y empalme (*splicing*) alternativo y diferente uso de promotores, aunque sólo tres son finalmente transcritas en el SNC: Nogo-A, Nogo-B y Nogo-C (Hunt et al., 2002a, Oertle and Schwab, 2003). Pertenecen a una familia de proteínas que se localizan en el retículo endoplasmático (RE), por lo que reciben el nombre de **familia Reticulon (RTN)**. Las proteínas RTN se expresan de forma ubicua en vertebrados (Oertle and Schwab, 2003). Los cuatro genes RTN de mamíferos (RTN1, RTN2, RTN3 y RTN4/Nogo), comparten una estructura génica similar y dan lugar a diferentes transcritos alternativos (Figura 9 A, B).

La región N-terminal es muy divergente entre los diferentes RTN y muestran poca o ninguna similitud de secuencia entre ellos (Yang and Strittmatter, 2007). Sin embargo, todos comparten una región C-terminal muy conservada conocida

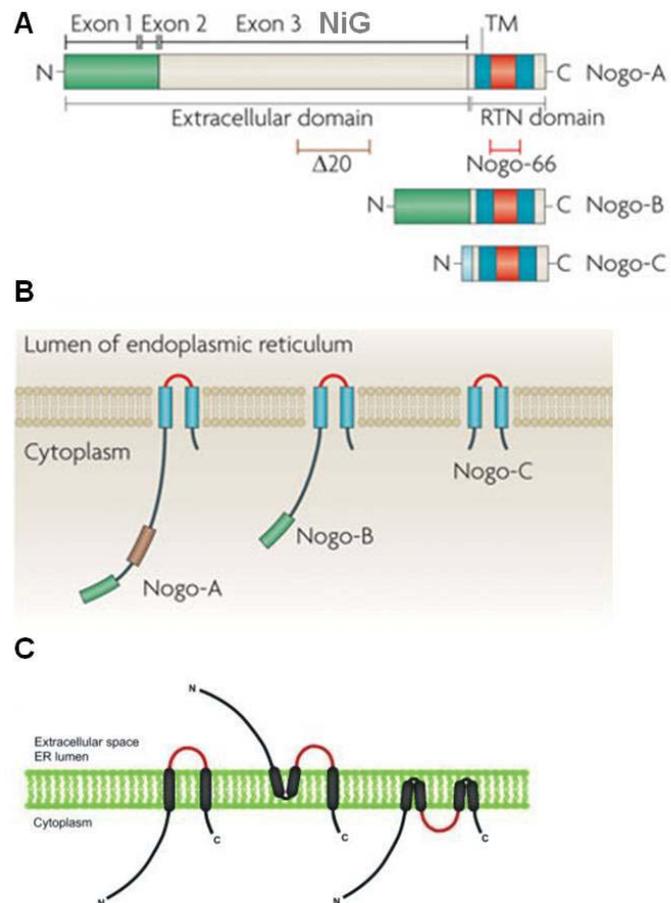


Figura 9. Estructura y topología de membrana de la familia Reticulon (RTN). A) Tres de los transcritos de los cuatro genes reticulón de mamíferos. La región C-terminal contiene el dominio conservado RHD o RTN, mientras que la región N-terminal es específica de cada parálogo y no muestra homología de secuencia con las otras proteínas. La región Nogo-66, situada entre los dos dominios transmembrana (TM), y la región NiG, específica de Nogo-A, son responsables de la inhibición del crecimiento neurítico. (Adaptado de Giger et al. 2010). B) Estructura y topología de membrana de las tres principales proteínas asociadas a la inhibición neuronal. C) Posibles topologías de membrana de las proteínas RTN. Las diferentes topologías y localización subcelular (RE o membrana plasmática) puede permitir que los RTN desempeñen diversas funciones en la célula. Adaptado de Yang y Strittmatter, 2007.

como **dominio RHD** (del inglés *reticulon-homology domain*). Éste consiste en dos regiones hidrofóbicas, de 28 a 36 aminoácidos cada una, que flanquean una región hidrofílica de 60-70 aminoácidos, seguido de una región C-terminal de 50 aminoácidos. El lazo o *loop* hidrofílico de la región RHD ha sido detectado tanto en la superficie celular como intracelularmente, por lo que se ha sugerido que los dominios hidrofóbicos pueden cruzar completamente la membrana plasmática o del retículo endoplasmático (RE) o doblarse para formar una horquilla (Figura 9C). De esta manera, las proteínas RTN pueden presentar diferentes topologías en la membrana celular o de RE, e incluso diferentes topologías dependiendo del tipo celular en el cual se expresen, lo que les confiere la capacidad de desempeñar funciones muy diversas (Yang and Strittmatter, 2007).

La **acción inhibitoria de Nogo-A** en el crecimiento neurítico está mediada al menos por dos dominios: **NiG**, la región específica de Nogo-A, y **Nogo-66**, la región de 66 aminoácidos flanqueada por las dos regiones transmembrana (Figura 9B). Puesto que esta región está presente en las tres isoformas, Nogo-A,-B y-C, las tres isoformas de Nogo tienen potencialmente propiedades inhibitorias para el crecimiento axonal. El dominio Nogo-66 inhibe el crecimiento axonal mediante la unión a NgR1 mientras que el dominio NiG supuestamente lo haría mediante su unión a integrinas (Hu and Strittmatter, 2008)

Nogo-A se expresa principalmente en el SNC, pero también en testículos y en el corazón a niveles más bajos. Nogo-B tiene una amplia distribución, tanto en SNC como en SNP, y Nogo-C se expresa fundamentalmente en músculo esquelético, aunque también en cerebro y corazón (Huber et al., 2002). A nivel celular, Nogo-A se expresa en oligodendrocitos del SNC, pero no en células de Schwann del SNP (Chen et al., 2000, GrandPre et al., 2000). Pero, además también se ha encontrado Nogo-A en diversos tipos neuronales del sistema nervioso adulto y en desarrollo (Tozaki et al., 2002, Mingorance et al., 2004). Por ejemplo, se ha descrito la presencia de Nogo-A en neuronas adultas de médula espinal, de ganglios de la raíz dorsal (DRG), hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, núcleo de habénula, corteza piriforme, núcleo rojo, núcleo oculomotor y núcleo trigeminal pontino (Josephson et al., 2001, Huber et al.,

2002, Hunt et al., 2002b). Su patrón de expresión aumenta desde estadios embrionarios hasta estadios adultos (Mingorance et al., 2004). Además, se ha descrito que se expresa en zonas presinápticas y postsinápticas; y un estudio reciente la presenta como un importante regulador negativo de la plasticidad en neuronas de hipocampo maduras (Aloy et al., 2006, Lee et al., 2008, Delekate et al., 2011). La expresión de Nogo-A en otros tejidos y, en particular en neuronas, y la amplia distribución de las isoformas Nogo-B y Nogo-C, sugieren que la familia de proteínas Nogo debe tener funciones adicionales a la de inhibición del crecimiento axonal. Por otro lado, aunque los astrocitos no presenten Nogo-A durante el desarrollo ni en estadios adultos en condiciones normales, sí que son capaces de expresarlo, transitoriamente, después de una lesión mecánica (Mingorance et al., 2004).

A nivel subcelular, se han propuesto dos topologías principales de Nogo-A, aunque no se pueden descartar otros tipos. En la primera, los dominios con función inhibitoria estarían localizados extracelularmente o en el lumen del RE, mientras que en la segunda topología sólo el dominio loop66 sería extracelular (Figura 9C). La localización exacta de Nogo-A en la superficie celular tiene un gran significado biológico. Cuando Nogo-A está presente en la superficie de oligodendrocitos del SNC adulto inhibe el crecimiento neurítico y la regeneración mediante la exposición extracelular de sus dominios inhibitorios (Oertle et al., 2003, Dodd et al., 2005). Sin embargo, una gran cantidad de Nogo-A intracelular está asociado a RE y complejo de Golgi, por lo que puede desempeñar una función diferente a la anterior (Oertle et al., 2003). Como se ha comentado anteriormente, Nogo-A también se expresa en neuronas y fibroblastos, tanto en RE como en superficie celular, lo que apunta la posibilidad de que pueda ejercer diferentes funciones según el tipo celular en el que se exprese y su localización subcelular (Oertle et al., 2003, Dodd et al., 2005).

Funciones de Nogo-A no asociadas a la inhibición del crecimiento axonal

Función en migración neuronal. Durante el desarrollo de la corteza cerebral, los precursores neuronales post-mitóticos que expresan Nogo-A migran a través de la glía radial Nogo-A positiva (Mingorance-Le Meur et al., 2007,

Mathis et al., 2010). Gracias a la generación de ratones KO se ha podido observar que la proteína Nogo-A facilita la migración tangencial temprana de las interneuronas corticales desde la eminencia media, mientras que en el caso de la migración de las células radiales ésta se ve reducida (Mingorance-Le Meur et al., 2007). *In vitro*, los precursores neurales corticales ven incrementada su migración, tanto en animales carentes de Nogo-A como en neuronas salvajes cultivadas en presencia de anticuerpos contra Nogo-A, NgR1 o Lingo-1, sugiriendo que la regulación de la migración durante el desarrollo temprano por parte de Nogo-A expresada en superficie celular tendría lugar vía el complejo Nogo Receptor 1. (Mathis et al., 2010).

Funciones en crecimiento neurítico, fasciculación y ramificación. Nogo-A es expresada fuertemente en las neuronas en crecimiento *in vivo*, incluyendo el cono de crecimiento (Tozaki et al., 2002, Mingorance-Le Meur et al., 2007). Algunos resultados contradictorios sugieren que en las neuritas y conos de crecimiento en desarrollo, Nogo-A puede influir en la fasciculación y en la formación de ramificaciones. Pero queda por determinar de manera clara si la etapa de desarrollo de las neuronas o bien su origen (ej. Neuronas corticales vs. DRGs) influye en la direccionalidad de los efectos decantándolos hacia la fasciculación o bien la ramificación (Mingorance-Le Meur et al., 2007, Petrinovic et al., 2010). También se ha demostrado su papel crucial en la estabilización y mantenimiento de la arquitectura de neuronas piramidales del hipocampo (Zagrebelsky et al., 2010).

Función en diferenciación neural. Las células progenitoras neurales pueden diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, por lo que se les ha considerado como una posible herramienta en terapias regenerativas del SNC. Sin embargo, cuando estos progenitores son trasplantados en la médula espinal, mayoritariamente se diferencian en células gliales y no en neuronas. Recientemente, se ha descrito que Nogo-A es capaz de inhibir la diferenciación neuronal de estos progenitores neurales y promover su diferenciación en células astrogliales a través de la vía NgR1 y mTOR-Stat3, pero sin implicar la activación de la vía de la quinasa RhoA (Wang et al., 2008a).

Funciones intracelulares. Debido a su localización en el RE, Nogo-A puede desempeñar diversas funciones intracelulares tanto en oligodendrocitos como en neuronas. Aunque no existen evidencias claras de estas funciones de Nogo-A, es razonable pensar que la gran cantidad de Nogo-A retenido en RE (tan sólo el 1% está presente en superficie celular) pueda ejercer alguna función, probablemente relacionada con aquellas ejercidas por las proteínas RTN. Por ejemplo, se conoce que RTN1-C y Nogo-B ejercen funciones proapoptóticas, al desplazar a Bcl-2 y Bcl-x_L desde la mitocondria al RE, impidiendo así sus funciones antiapoptóticas (Tagami et al., 2000, Li et al., 2001, Oertle and Schwab, 2003, Watari and Yutsudo, 2003). También se ha identificado que Nogo-A neuronal interacciona con la proteína GPR50, relacionada con desórdenes mentales, y que ambas colocalizan en espinas sinápticas. Además, en contraposición a Nogo-A, la sobreexpresión de GPR50 conlleva a un aumento en la longitud neurítica y en la formación de estructuras similares a filopodios y lamelipodios (Grunewald et al., 2009). Otras proteínas descritas recientemente como proteína que interaccionan con Nogo-A son la fosfodiesterasa CNP (del inglés *2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*) específica de oligodendrocitos (Sumiyoshi et al., 2009) y la ubiquitina ligasa WWP1 (Qin et al., 2008), lo que amplía el espectro de posibles funciones para Nogo-A. Además, Nogo-A se ha visto que podría tener un papel en la estabilización del ER (Schwab, 2010).

2.1.2. MAG

MAG (del inglés *Myelin-Associated Glycoprotein*), descrita en 1994 como inhibidor del crecimiento axonal (McKerracher et al., 1994, Mukhopadhyay et al., 1994), se localiza en la superficie de células mielinizantes: oligodendrocitos del SNC y células de Schwann del SNP. Sin embargo, aunque MAG sólo representa el 0,1% de las proteínas de la mielina periférica, en la mielina del SNC constituye uno de sus principales componentes (1% de la proteína total) (Trapp, 1990).

MAG es miembro de la superfamilia de las Inmunoglobulinas. Dentro de esta superfamilia, se puede distinguir el grupo de las Ig CAMs (*Inmunoglobulin Cell Adhesion Molecules*), formada entre otros por MAG, NCAM, L1, TAG-1 y DCC.

Este grupo se expresa ampliamente durante el desarrollo y juega un papel importante en el desarrollo axonal (Walsh and Doherty, 1997). Existen dos isoformas de MAG, generadas por *splicing* alternativo, S-MAG y L-MAG. Ambas moléculas comparten la región N-terminal formada por 5 dominios Ig extracelulares y un dominio transmembrana, pero difieren en su dominio intracelular. La isoforma L-MAG es la predominante durante el desarrollo, mientras que en el adulto predomina S-MAG (Tropak et al., 1988, Pedraza et al., 1991). Una diferencia con el resto de proteínas inhibitorias de la mielina es la presencia del fragmento soluble **dMAG**, producto de la actividad metaloproteínasa, que conserva la actividad de inhibición del crecimiento neurítico *in vitro* (Tang et al., 1997b, Milward et al., 2008).

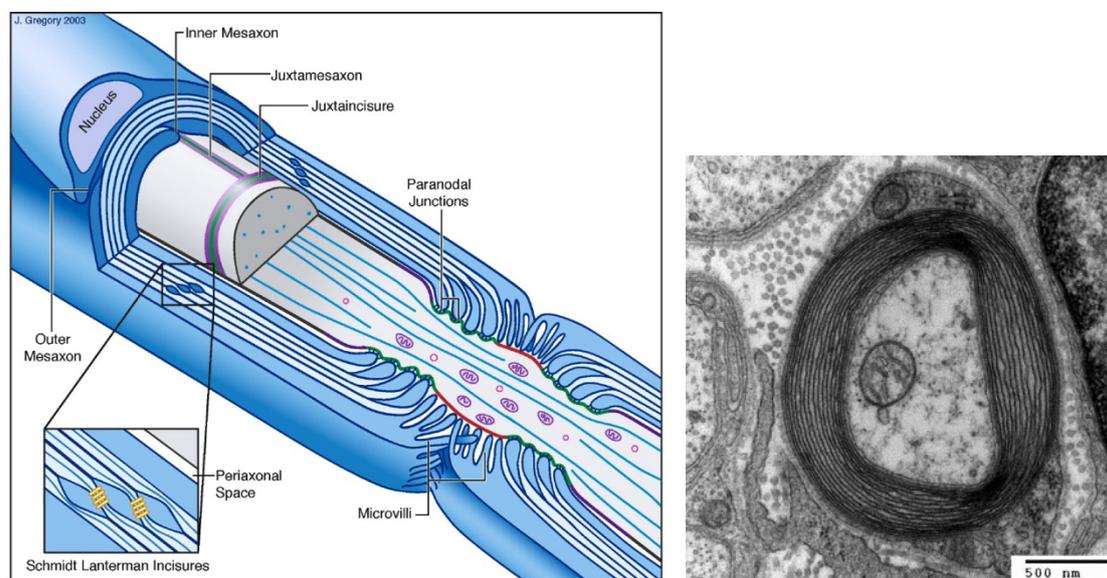


Figura 10. Vaina de mielina. A) Esquema de la organización de los nervios mielinizados. Sección a través del axón mielinizado (gris), rodeado por mielina, en rojo vemos el nódulo de Ranvier, y en verde los nódulos paranodales y sus uniones. En púrpura vemos la región juxtapanodal y en azul claro la mielina compacta. B) Micrografía electrónica de transmisión de un axonal mielinizado. Las capas de mielina (concéntricas) rodean el axón de una neurona, observando los orgánulos en su interior. Adaptado de Salzer et al. (Salzer, 2003).

Su unión a la superficie neuronal es en parte ácido-siálico dependiente y sensible a neuraminidasa (DeBellard et al., 1996, Kelm et al., 1996, Tang et al., 1997a, Vinson et al., 2001). Los gangliósidos GD1 y GT1b fueron sus primeros receptores neuronales descritos (Vinson et al., 2001, Vyas and Schnaar, 2001) debido a que al principio su papel en la inhibición del crecimiento neurítico se cuestionó, los receptores NgR1 y NgR2 (explicados en más detalle más adelante dentro de este capítulo) fueron funcionalmente asociados a MAG,

siendo descrita su interacción siálico dependiente y de gran afinidad con NgR2 (Venkatesh et al., 2005) .

Funciones de MAG no asociadas a la inhibición del crecimiento axonal

Función en mielinización. Parece ser que MAG ejerce un papel clave en los estadios iniciales de la mielinización y en el mantenimiento de las vainas de mielina, especialmente en el SNP (Schachner and Bartsch, 2000). Los ratones deficientes para MAG muestran un retraso en la formación de la mielina compacta y degeneración en los procesos distales de los oligodendrocitos (Quarles, 2009). Sin embargo, estas diferencias no son tan graves como cabría esperar, por lo que se ha sugerido que otras moléculas estarían actuando de forma compensatoria en estos animales. Después de la formación de la mielina, la localización de MAG se restringe a la región periaxonal, en contacto con los axones mielinizados, y está especialmente enriquecida en la región paranodal de las vainas de mielina (Figura 10). Debido a esta localización se ha propuesto que MAG participa en la estabilización de los contactos entre los axones y los procesos gliales, siendo necesaria para el mantenimiento y supervivencia de algunos axones ya que los ratones deficientes muestran atrofia axonal (Quarles, 2009). Sin embargo, se desconocen a fecha de hoy los receptores que pueden mediar esta señalización.

Función de MAG en crecimiento neurítico. MAG es una molécula bifuncional, cuyo efecto en el crecimiento neurítico depende del tipo celular con el que contacta y de la edad de dichas células. Por ejemplo, en neuronas neonatales de DRG promueve el crecimiento neurítico, mientras que en estadios adultos inhibe su crecimiento (Mukhopadhyay et al., 1994). Sin embargo, aunque se desconocen las bases moleculares que expliquen este cambio de función promotora a función inhibidora del crecimiento neurítico, algunos estudios apuntan al AMPc como molécula responsable (Cai et al., 2001).

2.1.3. OMgp

OMgp (del inglés *Oligodendrocyte Myelin glycoprotein*) es la proteína menos conocida de los tres inhibidores asociados a mielina, a pesar de que fue la primera en ser descrita (Mikol and Stefansson, 1988). Fue identificada en extractos de sustancia blanca humana y cultivos de oligodendrocitos de oveja y recibe su nombre por su localización específica en la mielina del SNC (aunque más tarde se observó que también era expresada en neuronas). La proteína

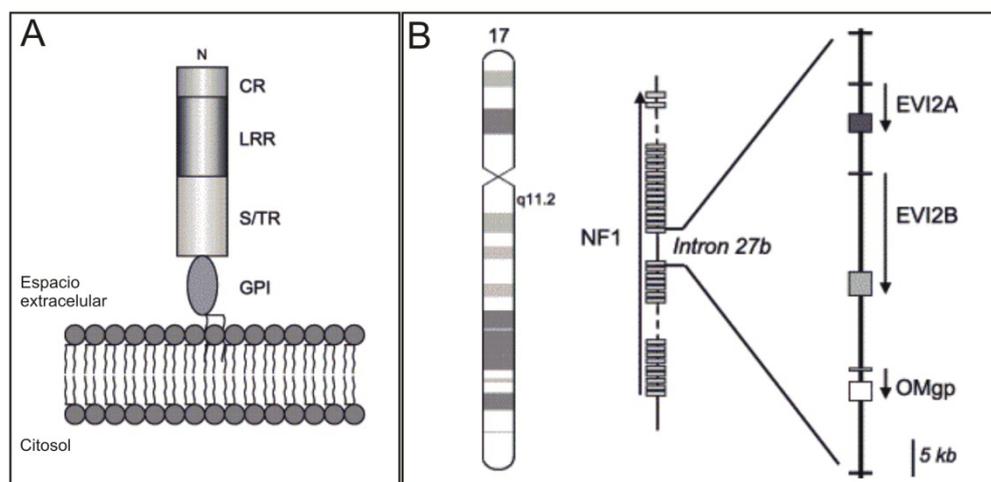


Figura 11. A) Representación esquemática de la forma madura de OMgp. CR es región rica en Cisteína; LRR, es región rica en repeticiones de Leucina; S/TR, región rica en Serina/Treonina y GPI es dominio glucosilfosfatidilinositol. B) Localización cromosómica del locus NF1 en el cromosoma 17. Los genes OMgp, EVI2A y EVI2B están embebidos dentro del intrón 27b del gen NF1. Las flechas indican la orientación de la transcripción y las cajas representan las regiones codificantes. *Adaptado de Vourc'h y Andres, 2004.*

madura consiste en un polipéptido de 401 aminoácidos (aunque la forma inmadura consta de 440), distribuidos en 4 dominios: un dominio N-terminal rico en residuos Cisteína, seguido de un dominio rico en residuos de Leucina (LRR), un dominio rico en residuos Serina-Treonina y un grupo glucosilfosfatidil inositol (GPI) por el cual se ancla a membrana plasmática (Mikol et al., 1990b) (Figura 11). El dominio más importante para su función es el dominio LRR, que consiste en 8 repeticiones en tándem de residuos leucina (Vourc'h et al., 2003b) y caracteriza a OMgp como miembro de la familia de proteínas LRR. Además, es esta región la que permite que OMgp se una a NgR1 (Wang et al., 2002b). El esqueleto proteico de la forma madura de OMgp se corresponde con un peso molecular de 46 kDa. Sin embargo, debido a modificaciones

postraduccionales de glicosilación, su peso molecular final es de 110-120 kDa (Mikol et al., 1990b).

Inicialmente, se describió la presencia de OMgp en oligodendrocitos, pero posteriormente se mostró que su localización mayoritaria se daba en neuronas (Habib et al., 1998b, Gil et al., 2010). En concreto, se describió que en el adulto, OMgp estaba presente en neuronas de proyección como las neuronas piramidales del hipocampo, neuronas de Purkinje del cerebelo, neuronas del hipotálamo y motoneuronas del tronco cerebral. El patrón temporal de expresión de OMgp ha sido caracterizado durante el desarrollo postnatal del SNC, y muestra un aumento progresivo desde el nacimiento hasta el adulto (Habib et al., 1998b, Vourc'h et al., 2003a). Recientemente se ha descrito que la OMgp neuronal está presente en las etapas tempranas del desarrollo (a partir del estado embrionario E14), localizándose en los axones en crecimiento durante la formación del tracto axonal y seguidamente presente en la maduración de las conexiones corticales como son las proyecciones tálamo-corticales y la vía perforante (Gil et al., 2010). Además, subpoblaciones de interneuronas del hipocampo expresan OMgp en edades adultas. A nivel celular, OMgp también está presente en la membrana neuronal, en fracciones sinaptosómicas y en las varicosidades axonales, en cultivos primarios de neuronas de hipocampo (Gil et al., 2010). Estos últimos resultados indican que OMgp se expresa en etapas embrionarias antes del proceso de mielinización, lo que sugiere que al igual que otras MAIs, OMgp tendría un papel adicional durante el desarrollo perinatal.

Funciones de OMgp no asociadas a la inhibición del crecimiento axonal

Función de OMgp en proliferación celular. Como se ha comentado anteriormente, el gen *omgp* está dentro del intrón 27b del gen NF1, que codifica para la proteína Neurofibromina 1 (Mikol et al., 1990a). En condiciones normales, la proteína Neurofibromina 1 regula negativamente al proto-oncogen Ras mediante su actividad GTPasa. La mutación de la proteína ocasiona una disminución de la actividad GTPasa con la consiguiente proliferación de células mediadas por Ras-GTP. Esto da lugar a la *neurofibromatosis de tipo 1*, un desorden caracterizado por neurofibromas (tumores formados por células de

Schwann y fibroblastos), manchas en el iris (nódulos de Lisch), manchas “café con leche” en la piel, defectos en el aprendizaje, macrocefalia y predisposición a neurofibrosarcomas malignos y gliomas ópticos (Trovo-Marqui and Tajara, 2006).

Cuando se sobreexpresa el gen NF1 en células NIH3T3 se produce una inhibición en el crecimiento de estas células (Johnson et al., 1994). Sorprendentemente, Habib y colaboradores, observaron que OMgp, al igual que la Neurofibromina 1, tenía funciones supresoras de la proliferación cuando era sobreexpresado en fibroblastos NIH3T3 y además, inhibía vías de señalización relacionadas con aquéllas reguladas por la Neurofibromina 1 (Habib et al., 1998a). Además, se ha demostrado que para desempeñar esta función en células COS-7 es necesario el dominio LRR de OMgp y no su grupo GPI. Puesto que NgR1 no se expresa en este tipo celular, deben existir otros receptores de superficie necesarios para transducir las señales antiproliferativas al interior de las células (Vourc'h et al., 2003b). Aunque esta acción supresora ha sido estudiada sólo en células NIH3T3 y COS-7, no se puede descartar que OMgp pueda desempeñar una función similar en neuronas y oligodendrocitos, tanto en el desarrollo como en el adulto. En línea con esto, recientemente se ha descrito que células madre neurales procedentes de embriones de rata expresan OMgp. La sobreexpresión de OMgp en neuroesferas procedentes de estas células madre reduce su proliferación aunque no afecta a su diferenciación en neuronas (Martin et al., 2009).

Papel de OMgp en especificación de dianas axonales y en sinapsis. El marcaje de OMgp aparece durante la primera etapa del desarrollo de los barriles (*barrel-field*) (P4-P5), lo que sugiere que OMgp juega un papel temprano en el refinamiento de las conexiones de los axones tálamo-corticales durante el desarrollo cortical (Gil et al., 2010). Por otro lado, la expresión de OMgp en tractos axonales, fracciones sinaptosómicas y varicosidades axonales (Gil et al., 2010) junto con la expresión de otras proteínas asociadas a la mielina como Nogo-A, en los contactos sinápticos (Liu et al., 2003b) y en tractos axonales (Mingorance-Le Meur et al., 2007); o bien la confirmación que

receptores como el NgR1 regulan la transmisión sináptica (Lee et al., 2008) abren la posibilidad de una putativa función de OMgp en sinapsis.

2.2. Receptores

2.2.1. NgR1

La proteína Nogo receptor 1, NgR1, fue identificada en un primer momento como proteína receptora del *loop* Nogo-66 (Fournier et al., 2001), aunque posteriormente se observó que constituye un receptor común para los tres inhibidores asociados a mielina, Nogo-A, MAG y OMgp, aún incluso cuando éstos no muestran ninguna homología estructural o de secuencia entre sí.

El gen *NGR* codifica para una proteína de 473 aminoácidos anclada a la membrana neuronal mediante dominio GPI y localizada en microdominios lipídicos (*lipid rafts*), que son microdominios de membrana con alto contenido en colesterol (32%) y esfingolípidos (14%) (Fournier et al., 2001). Al igual que OMgp, NgR1 pertenece a la familia de proteínas LRR. Contiene un dominio N-terminal rico en Leucinas (LRR-NT), seguido de ocho dominios LRR, un dominio C-terminal rico en Cisteínas (LRR-CT) y un dominio C-terminal único por el cual se une al grupo GPI (Barton et al., 2003). Se han identificado dos homólogos para NgR1 en ratón y humanos, **NgR2** y **NgR3**, que muestran una homología del 55% entre ellos y un 45% de identidad respecto a NgR1 (Pignot et al., 2003).

Se han llevado a cabo diversos análisis de mutagénesis funcional para identificar aquellos dominios implicados en la unión a ligandos y correceptores, aunque los resultados obtenidos son controvertidos. En primer lugar, se describió que todos los dominios LRR eran necesarios para la unión a Nogo-66 (Fournier et al., 2001). Sin embargo, Wang demostró que para la unión a Nogo-66 se requiere el dominio LRR-CT, mientras que para la unión a OMgp se necesita a los dominios LRR y LRR-CT (Wang et al., 2002b). Debido a que MAG compite con Nogo-66 por la

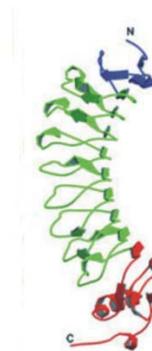


Figura 12. Vista ortogonal de la estructura de NgR1. El dominio LRRNT está representado en azul, los dominios centrales LRR en verde y el dominio LRRCT en rojo. Adaptado de Barton et al., 2003.

unión a NgR1, se ha sugerido que MAG se une también al dominio LRR-CT (Domeniconi et al., 2002).

La región C-terminal única es requerida para la transducción de señal, probablemente mediante su unión a otros correceptores, mientras que el grupo GPI, aunque no es necesario para la señalización, modula la eficacia de la señalización. Además, el grupo GPI permite que NgR1 se localice en *lipids rafts* y proporciona una zona de escisión, por la cual se libera el fragmento NgR soluble. Este fragmento soluble puede antagonizar los efectos inhibitorios de Nogo-66 o de la mielina y tiene afinidad por NgR1 de superficie celular, lo que indica que puede formar homodímeros *in vivo* (Fournier et al., 2002a). Recientemente se ha descrito la capacidad de fosforilación de los receptores NgR por la caseína quinasa II (CK2), lo que podría dar lugar también a una anulación del efecto inhibitorio sobre el crecimiento neurítico, al impedir la unión del receptor fosforilado con las MAIs (Takei, 2009).

En general, NgR1 se expresa en poblaciones discretas de neuronas postmitóticas y, en particular, en sus axones y contactos sinápticos (pre y postsinápticamente) (Wang et al., 2002c, Mingorance et al., 2004, Lee et al., 2008). Durante el desarrollo, los niveles de proteína son bajos, aunque se puede detectar NgR1 en el hipocampo, corteza cerebral y médula espinal. Los niveles aumentan con la edad, así como los tipos neuronales en los que se expresa. En el adulto, se observa en todas las capas de la corteza cerebral, en neuronas piramidales y granulares del hipocampo, amígdala, tálamo, *substantia nigra*, *caudatus putamen*, neuronas de Purkinje y granulares del cerebelo y motoneuronas de médula espinal. Se han obtenido similares resultados en rata y humano (Josephson et al., 2002, Funahashi et al., 2008). El hecho de que NgR1 no se exprese en todas las poblaciones neuronales del SNC adulto, pero que si expresan Nogo-A ó OMgp, sugiere que no todas las células son sensibles al efecto inhibitorio de las proteínas asociadas a mielina, por lo que pueden ejercer una función diferente (mediante unión a otros ligandos) o bien existir otros receptores para estos ligandos (Hunt et al., 2002a). De hecho, recientemente se han caracterizado nuevos ligandos para NgR1, por un lado, la proteína BLYS (del inglés, *B Lymphocyte stimulator*), no

asociada a mielina. Se trata de una proteína de la familia TNF (del inglés, *Tumor Necrosis Factor*) esencial para el desarrollo de células B y que se expresa en niveles elevados en pacientes con esclerosis múltiple. Se ha demostrado que la unión de BLYS a NgR1 inhibe el crecimiento neurítico en DRG. Además, la expresión de BLYS y NgR1 está asociada a astrocitos y microglía/macrófagos en zonas lesionadas de médula espinal. Así, BLYS puede funcionar independientemente de los inhibidores asociados a mielina y como ligando redundante de NgR1 para inhibir el crecimiento axonal (Zhang et al., 2009a). Por otro lado, la LGI1 (del inglés, *Leucine-rich Glioma Inactivated*), proteína secretable que comparte homología con los miembros de la familia SLIT, se ha revelado como un nuevo ligando capaz de unirse al NgR1, aunque en este caso, el efecto regulador es indirecto y opuesto. LGI1 actúa incrementando el crecimiento de DRGs sobre sustratos derivados de la mielina y previene del colapso del cono axonal inducido por la misma. Este efecto es producido por la asociación entre el NgR1 y los receptores ADAM22 incrementándose así la unión de LGI1 éstos últimos (Thomas et al., 2010).

2.2.2. p75^{NTR}/TROY/Lingo-1

La falta de un dominio intracelular en NgR1 capaz de transducir la señal desencadenada por su unión a los diferentes ligandos, sugería la existencia de otras moléculas correceptoras. En esta búsqueda de posibles correceptores para NgR1 se identificaron tres proteínas: p75^{NTR}, Lingo-1 y TAJ/TROY.

p75^{NTR}. Proteína receptora perteneciente a la superfamilia TNFR (del inglés *Tumor Necrosis Factor Receptor*). La mayoría de los miembros de esta familia son proteínas transmembrana tipo I que presentan en su región extracelular (dominio Nt) un número variable de repeticiones ricas en Cisteína, implicadas en la unión a ligandos (Gruss and Dower, 1995). La proteína p75^{NTR} (75 kDa) consiste en una región extracelular con cuatro dominios IgG ricos en Cisteína, una región transmembrana y una región intracelular con dominio de muerte (DD) (del inglés *Death Domain*). Esta región intracelular no presenta actividad enzimática intrínseca, por lo que contiene motivos de unión a otros receptores o proteínas efectoras.

p75^{NTR} se expresa ampliamente durante el desarrollo del SNC y SNP, pero sus niveles de expresión disminuyen dramáticamente con la edad. En el ratón adulto, la expresión se reduce a un número pequeño de neuronas de proyección, como son neuronas sensoriales de DRG, motoneuronas de médula espinal, neuronas colinérgicas del telencéfalo basal, neuronas ganglionares de retina y neuronas de Purkinje del cerebelo. Además, también se expresa en diversas poblaciones gliales, como oligodendrocitos y células de Schwann, especialmente durante el desarrollo y tras lesión. Además, se piensa que también podría estar ejerciendo algún papel en la mielinización (Roux and Barker, 2002, Chen et al., 2009).

El hecho de que no se hallara regeneración axonal en animales deficientes en p75^{NTR} (Song et al., 2004), así como la falta de expresión de dicha proteína en estadios adultos, y en concreto, en poblaciones neuronales sensibles al efecto inhibitorio de proteínas asociadas a mielina, hizo pensar que existía un segundo correceptor para NgR1. Así, dos laboratorios independientes, en su búsqueda por encontrar otros receptores de la familia TNFR con potencial para funcionar como p75^{NTR}, describieron que TROY, el miembro de esta familia que más se asemejaba a p75^{NTR}, era capaz de unirse a NgR1 y desencadenar la inhibición de crecimiento neurítico dependiente de NgR1 (Park et al., 2005, Shao et al., 2005). Además, demostraron que ratones deficientes en TROY tenían una sensibilidad muy reducida a mielina (Shao et al., 2005) y que la aplicación de la forma dominante negativa de TROY promovía el crecimiento neurítico de células de DRG sobre mielina (Park et al., 2005).

TROY. Conocido como **TAJ** o **TNFRS19**, es miembro de la familia TNFR (Eby et al., 2000). Es una proteína transmembrana tipo I, de 416 aminoácidos y de un peso molecular de 45 kDa, con dominios ricos en Cisteína en la región extracelular. En su región citoplasmática posee una secuencia de unión a TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*), pero a diferencia de p75^{NTR} no contiene dominio intracelular de muerte (Kojima et al., 2000).

En el embrión de ratón, TROY (*TNFRSF expressed on the mouse embryo*) está presente a nivel de ARNm principalmente en cerebro y derivados epiteliales, aunque también se expresa de forma moderada en pulmón, hígado, corazón

(Kojima et al., 2000). En el SNC en desarrollo, TROY se expresa fuertemente en la zona ventricular (ZV) y en la zona subventricular (ZSV) de diversas regiones, incluyendo corteza cerebral, tálamo e hipocampo pero disminuye hacia estadios más tardíos de la neurogénesis (Hisaoaka et al., 2003). También se expresa en bulbo olfativo en desarrollo, desde E13.5 hasta estadios neonatales. En la etapa adulta, la expresión de TROY disminuye, al igual que la de p75^{NTR}, pero sus niveles se mantienen más altos que los de p75^{NTR}, lo que sugirió que TROY podía sustituir a p75^{NTR} en el complejo Nogo Receptor. Además, a diferencia de p75^{NTR}, la cual se expresa sólo en determinadas poblaciones neuronales, TROY se expresa ampliamente en diversos tipos celulares del cerebro incluyendo neuronas, astrocitos, microglía y células de glía envolvente. TROY por tanto formaba parte del complejo receptor NgR el cual a través de la señalización intracelular daba lugar, en última instancia, a la activación de la proteína RhoA (Park et al., 2005, Shao et al., 2005).

Lingo-1. Debido a que la cotransfección de NgR1 y p75^{NTR} (o TROY) en células no neuronales era incapaz de activar la vía de señalización de RhoA, se prosiguió en la búsqueda de nuevas proteínas capaces de interactuar con NgR1. Así fue cómo se identificó a **Lingo-1** (*LRR and Ig domain-containing, Nogo Receptor interacting protein*) como miembro del complejo receptor (Mi et al., 2004).

Lingo-1 es una proteína transmembrana tipo I, codificada por el gen *Lrrn6a* (*Leucine rich repeat neuronal 6a*). Su parte extracelular contiene 9 dominios LRR, flanqueados por dominios LRR en N y C-terminal y un dominio IgC2, el cual está implicado en interacciones proteína-proteína. El dominio citoplasmático es de longitud corta y contiene un sitio de fosforilación en Tirosina similar a EGFR (Carim-Todd et al., 2003, Mi et al., 2004). El dominio C-terminal parece tener un papel importante en el proceso inhibitorio; mediante *screening* se descubrió la interacción con el factor de transcripción Myt1l que al igual que Lingo-1 incrementaba sus niveles de expresión en citoplasma después de lesión de la médula espinal (Wrathall et al., 1998, Mi et al., 2005). La activación de Lingo-1 podría dar lugar a la retención del factor de transcripción en el citoplasma o bien daría lugar al acoplamiento de cofactores o enzimas de modificación a Myt1l afectando la especificación neuronal y

proliferación después de lesión (Llorens et al., 2008). Recientemente se ha descrito la interacción de Lingo-1 con una nueva molécula intracelular de transducción de señal, la serina-treonina quinasa WNK1 (del inglés, *With No lysine [K]*) involucrada directamente en el proceso de inhibición de la extensión neurítica a través de su efecto regulador sobre la activación de RhoA (Zhang et al., 2009b).

Lingo-1 pertenece a una subfamilia de proteínas con LRR que comprende a otros tres parálogos: Lingo-2, Lingo-3 y Lingo-4, con los que comparte una moderada homología a nivel de proteína (61, 56 y 44 % de identidad respectivamente). Por el contrario, Lingo-1 muestra un alto grado de conservación entre especies, siendo la homología entre los ortólogos de ratón y humano de un 99,5%, lo que sugiere que Lingo-1 desempeña funciones críticas en vertebrados.

Diversos estudios han demostrado que el ARNm de Lingo-1 se expresa exclusivamente en el SNC, durante el desarrollo y en estadios adultos de rata y ratón de manera que estos disminuyen con la edad (Mi et al., 2005). La proteína Lingo-1 se expresa de forma predominante en corteza, hipocampo, tálamo, amígdala y en niveles más bajos en el cerebelo. Además de expresarse en poblaciones concretas de neuronas, como en neuronas piramidales de la corteza cerebral, en las Purkinje del cerebelo y en la mayoría, pero no en todas, las interneuronas del hipocampo (Llorens et al., 2008).

2.2.3. PirB

Durante los últimos años, poco a poco han ido surgiendo nuevas moléculas y nuevos receptores involucrados en la vía de inhibición del crecimiento axonal tras lesión.

El último receptor en ser descrito ha sido el PirB (del inglés, *Paired immunoglobuline-like receptor-B*). Proteína transmembrana de tipo I de la familia de los PIR, receptores relacionados con el sistema inmune, compuesto por seis dominios extracelulares tipo inmunoglobulina y un polipéptido intracelular que alberga cuatro ITIMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*) (Atwal et al., 2008). Los *paired immunoglobulin-like receptors*,

PirA y PirB, que fueron inicialmente identificados como homólogos de receptor humano Fc (FcR) para las inmunoglobulinas A (IgA) (Hayami et al., 1997, Kubagawa et al., 1997), son los ortólogos murinos de los LILR (*Leucocyte Immunoglobulin-Like Receptors*) humanos (Hayami et al., 1997, Kubagawa et al., 1997, Yamashita et al., 1998, Wende et al., 1999, Takai and Ono, 2001). A pesar de que los homólogos humanos poseen solamente 4 de los dominios Ig, se piensa que la capacidad de unión con los ligandos se encuentra en los dos primeros dominios.

Tanto PirA como PirB se unen eficientemente con moléculas MHC de clase I en el sistema inmune, conjunto de moléculas heterodiméricas de expresión generalizada que participan de manera importante en la presentación de antígenos. Estas moléculas son expresadas por neuronas en diferentes regiones del SNC (Figura13) y parece ser que su expresión coincidiría con periodos del desarrollo con una gran plasticidad sináptica en dichas regiones

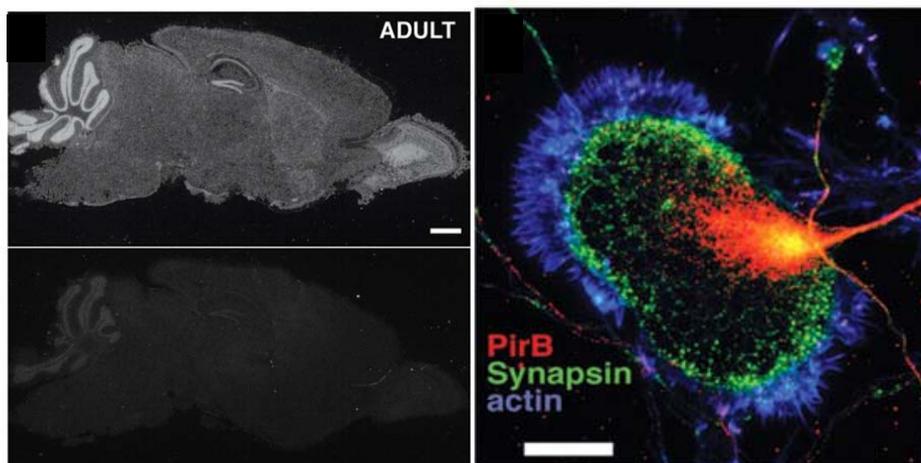


Figura 13. Expresión del RNAm y proteína de PirB en neuronas. Hibridación *in situ* en sección sagital de ratón adulto (panel superior) y control *anti-sense* (panel inferior). B) Cono de crecimiento de neurona cortical 3 días *in vitro* (DIV) con marcaje anti-PirB 1477 (rojo), faloidina (azul) ya anti-sinapsina (verde). *Adaptado de Syken et al. 2006.*

(Goddard et al., 2007, Boulanger, 2009). De la misma manera la detección de la expresión de PirB en subpoblaciones neuronales se cree juega un papel importante restringiendo la plasticidad en el caso de la corteza visual (Syken et al., 2006); papel similar al sugerido para el NgR1 (McGee et al., 2005) y que propició las primera pista para hipotetizar sobre la posible función de PirB como receptor inhibitor el crecimiento axonal.

PirB se ha demostrado que es capaz de unirse a MAG, Nogo-66 y OMgp con una gran afinidad. A pesar de que la supresión de la actividad endógena de PirB mediante el uso de anticuerpos bloqueantes o modificaciones genéticas, rescata parcialmente la inhibición del crecimiento neurítico provocado por extractos de mielina o MAIs en neuronas granulares del cerebelo (Atwal et al., 2008), es posible que PirB no juegue un papel crítico en la inhibición de la plasticidad axonal en algunos modelos específicos, como en el caso del modelo de lesión cortical de ratón dónde Omoto y colaboradores demuestran que no hay una mejoría del *sprouting* en el tracto cortico espinal (CST) ni en el rubro espinal (CRT) en animales *knockout* para PirB después de lesión (Omoto et al., 2010).

INTRODUCCIÓN III

Señalización intracelular

El incremento progresivo del número de nuevas moléculas inhibitorias asociadas a la mielina, y de nuevas moléculas y receptores implicados en el proceso inhibitorio, está haciendo que los esfuerzos de los investigadores se centren cada vez más en intentar comprender y definir sus mecanismos de acción.

La búsqueda de moléculas intermediarias implicadas en la posterior señalización tiene gran interés tanto biológico como clínico. Como ya hemos comentado en el apartado anterior algunos de los receptores de las moléculas inhibitorias como Nogo-A, MAG y OMgp incluyen los miembros de la familia Nogo receptor (NgR1 y NgR2), PirB, gangliósidos, Lingo-1, TROY, integrinas e incluso el EGFR, este último a través de un proceso de transactivación con el NgR1 (Koprivica et al., 2005, Yiu and He, 2006). Muchos de estos sistemas ligando-receptor comparten mecanismos y componentes de señalización intracelular comunes que desencadenan una serie de **modificaciones del citoesqueleto neuronal** (afectando tanto la actina como los microtúbulos), además de **modificaciones en niveles de expresión de proteínas y factores de transcripción** que modularan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. En este apartado, se describirán de forma general algunos de los componentes, quinasas y proteínas implicadas en la señalización que afecta al citoesqueleto, sin dejar de lado un breve comentario con respecto a las modificaciones transcripcionales.

3.1. Modificaciones del citoesqueleto neuronal

Las neuronas poseen una de las más complejas y diversas morfologías si las comparamos con otros tipos celulares, estas son capaces de extender dos tipos de procesos citoplasmáticos: axones y dendritas, los cuales en desarrollo están guiados por una estructura compleja, el cono de crecimiento axonal y dendrítico. El modelado o tasa de recambio en el cono de crecimiento es un proceso complejo en el que, la motilidad

basada en la **actina** es utilizada para producir un avance persistente y dirigido de los **microtúbulos** (Figura 14). Los cambios morfológicos que experimentan las neuronas durante su vida son esenciales para la correcta conexión del cerebro durante el desarrollo y para su funcionamiento en adultos.

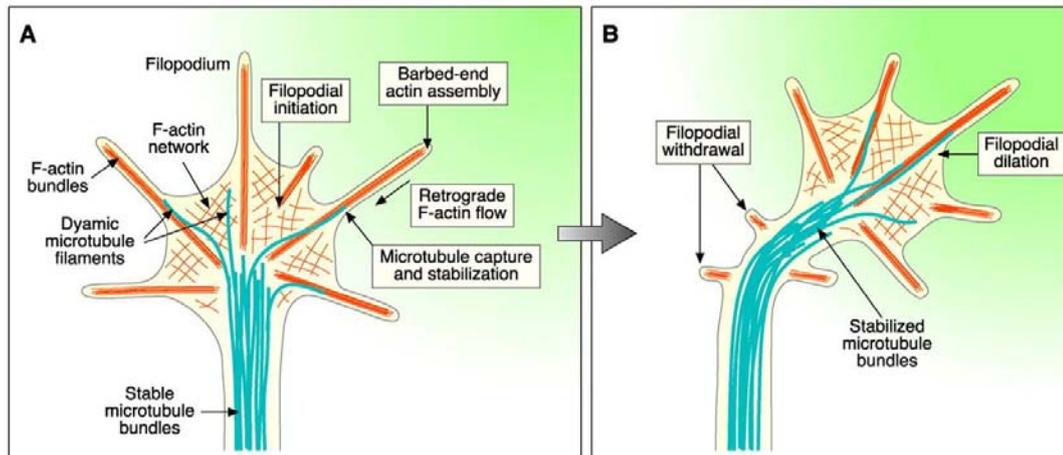


Figura 14. Modelo de cono de crecimiento. A y B) Modelo que muestra la forma en la que un cono de crecimiento podría girar hacia una sustancia quimioatrayente (verde). *Adaptado de Dickson et al. 2002.*

Comprender los mecanismos que controlan estos eventos podría darnos las pistas necesarias para saber cómo las neuronas pierden funcionalidad con la edad y en **situaciones de lesión** o enfermedad.

3.1.1. Citoesqueleto de actina. Los filamentos de actina se organizan en dos poblaciones diferentes en el cono de crecimiento: i) densa, filamentos paralelos emitidos hacia el exterior y que dan lugar a los filopodios; y ii) redes intermedias flexibles, de filamentos entreteljidos, que dan lugar a los lamelipodios (Lewis and Bridgman, 1992). Estudios de finales de los 80 y principios de los 90 realizados en axones del molusco marino *Aplysia*, ayudaron a descifrar un mecanismo general del control de la extensión/retracción filopodial. Se comprobó que el ensamblaje de los monómeros de actina se produce en el borde del cono de crecimiento, lo que da lugar a la extensión de filopodios y lamelipodios; al mismo tiempo, existe un flujo neto de actina filamentosa (actina-F) en sentido opuesto (flujo retrógrado). Por lo tanto se comprobaba que el crecimiento neto de

filopodios y lamelipodios dependía de la tasa de polimerización (positiva o negativa) de actina (Lin and Forscher, 1995).

La tasa de polimerización, que sustenta el dinamismo del citoesqueleto de actina, es clave para los cambios morfológicos que sufren las neuronas durante el desarrollo y también en el proceso de regeneración y depende directamente de que las señales extracelulares, que dirigen los cambios, sean correctamente interpretadas por los receptores de la superficie celular que finalmente desencadenarán una señalización intracelular que dará lugar a una extensión o bien a una retracción del axón.

A pesar de que los mecanismos moleculares que conectan la señalización de los receptores, implicados en el proceso inhibitorio de la regeneración, con el citoesqueleto no están completamente descritos, existen varias moléculas y vías involucradas en esta señalización. Por ejemplo muy recientemente, se ha descrito la participación de una nueva proteína, POSH (del inglés, *scaffold protein Plenty of SH3s*) que actúa *downstream* de Nogo66 y PirB modificando el citoesqueleto de actina y finalmente produciendo la inhibición del crecimiento axonal (Dickson et al., 2010).

En este apartado describiremos en más detalle la familia de las GTPasas, una de las más importantes en la regulación del citoesqueleto de actina.

Rho GTPasas. Debido a sus conocidas funciones regulando la dinámica del citoesqueleto en fibroblastos, las Rho guanosin trifosfatasa (GTPasas) se posicionaron como firmes candidatas para llevar a cabo la transducción de señales en el cono de crecimiento. Tres de los miembros de la familia más estudiados, implicados en la motilidad neuronal, son: RhoA, Cdc42 y Rac1.

Así, mientras Rac1 y Cdc42 estimulan la formación de filopodios y lamelipodios; en el caso de RhoA, ésta provoca el colapso del cono de crecimiento y la retracción neurítica/axonal (Pasterkamp and Kolodkin, 2003, Negishi et al., 2005) en respuesta a diferentes estímulos extracelulares.

Los dominios activos de las proteínas inhibitorias presentes en la mielina y los CSPGs se ha demostrado activan RhoA y producen la disminución de la actividad de Rac1 (Jain et al., 2004, Govek et al., 2005, Gopalakrishnan et al., 2008). A través del receptor de neurotrofinas p75NTR (y posiblemente TROY) se produce la activación de RhoA (Yamashita and Tohyama, 2003) que desencadenará la activación de una serie de quinasas y la consiguiente inhibición del crecimiento axonal.

Además de su función primordial sobre la regulación del citoesqueleto de actina ciertos miembros de la familia Rho GTPasa así como alguna de las quinasas que participan en su vía de señalización, participan también en la regulación de la comunicación entre el citoesqueleto de actina y el de microtúbulos.

3.1.2. Citoesqueleto microtubular. El otro pilar fundamental de sustentación de las neuronas son los microtúbulos, éstos forman haces estables y entrecruzados a lo largo de axones y dendritas además de formar filamentos microtubulares únicos capaces de internarse en el cono de crecimiento, preferentemente en los filopodios, y que muestran las propiedades clásicas de inestabilidad dinámica, extendiéndose o

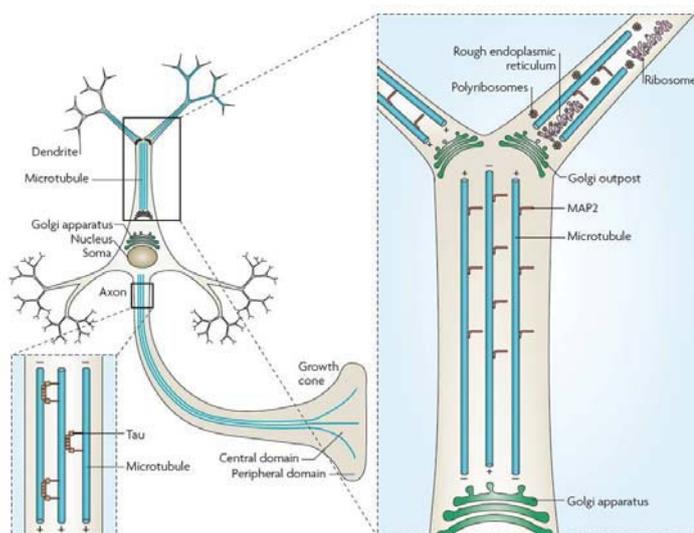


Figura 15. Organización microtubular y distribución de orgánulos en axones y dendritas. Los axones tienen microtúbulos unidos a Tau con orientación uniforme, mientras que en dendritas están asociados a MAP2 con orientación mixta. *Adaptado de Conde et al. 2009.*

retrayéndose según el comportamiento del cono de crecimiento, además de presentar una serie de configuraciones muy complejas que reflejan la relación entre la tasa de extensión microtubular y la tasa de avance del cono de crecimiento (Figura 15) (Tanaka and Kirschner, 1991,

Tanaka and Sabry, 1995).

Con respecto a la organización microtubular de axones y dendritas existen dos diferencias principales (Figura 16)

Primero, la orientación: los microtúbulos axonales tienen una orientación uniforme con los extremos positivos orientados hacia los puntas de los axones, mientras que en las dendritas adoptan una orientación mixta. Segundo, difieren en las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (del

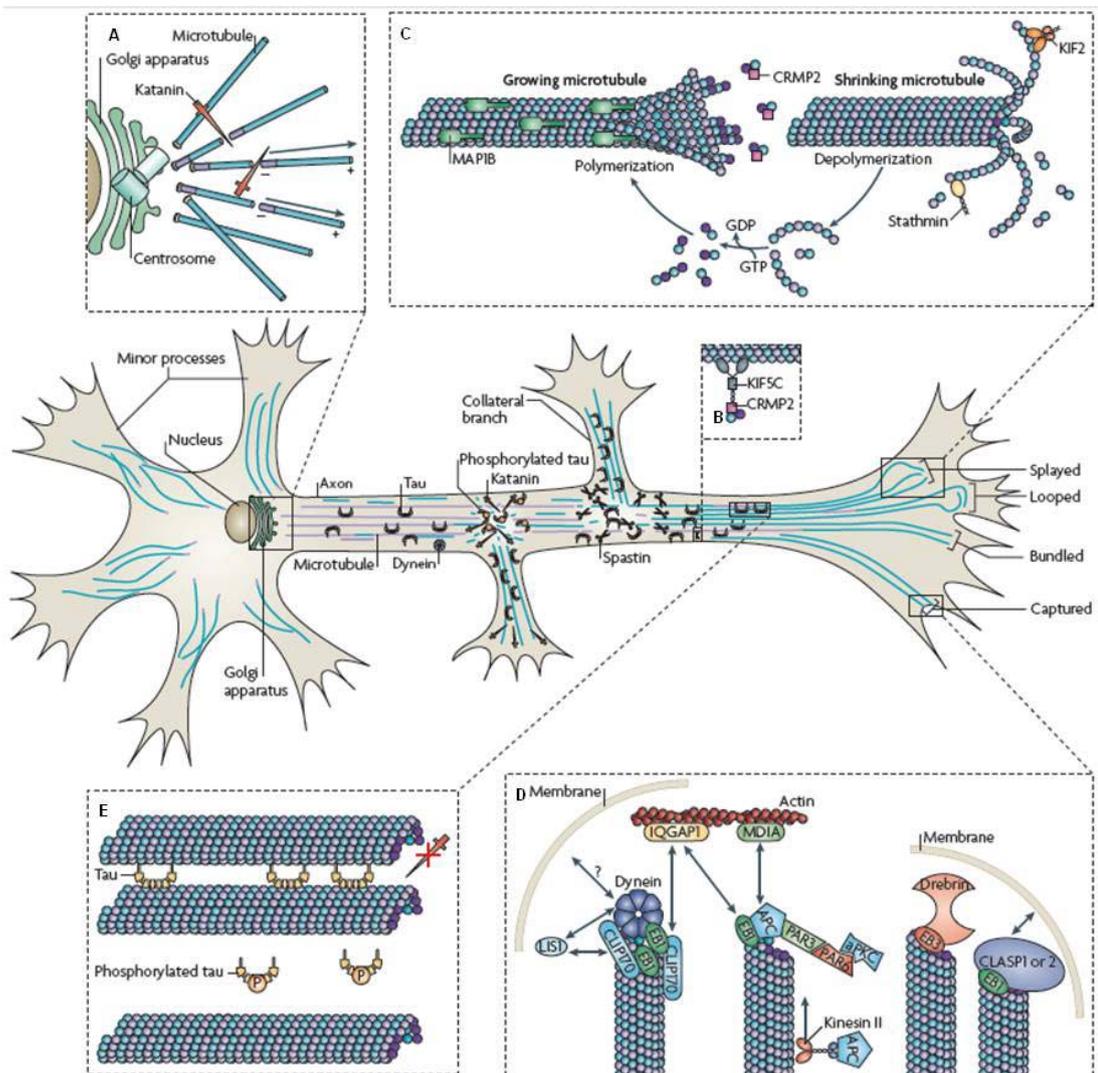


Figura 16. Regulación microtubular en una neurona de hipocampo en desarrollo. A) Liberación de MTs por la katanina. Los pequeños polímeros son transportados a lo largo de los MTs por la dineína. B) Transporte de dímeros de tubulina u oligómeros al cono de crecimiento. C) Ilustra el comportamiento de la dinámica microtubular. Proteína como CRMP2 o MAP1B contribuyen al ensamblaje o mantenimiento microtubular. D) Maquinaria proteica involucrada en la captura microtubular en la membrana celular, principalmente del cono de crecimiento E) Muestra como Tau protege el efecto de la katanina contribuyendo así a la estabilización microtubular y evitando un exceso en el *branching* colateral. Adaptado de Conde et al. 2009.

inglés *Microtubule Associated Proteins*): por ejemplo, mientras que **MAP2** se encuentra principalmente en dendritas, la proteína **Tau** lo hace principalmente en axones.

Las proteínas MAPs se encargan de regular la estabilidad microtubular, estabilizando o desestabilizando los microtúbulos recién formados. Este equilibrio juega un papel fundamental en procesos determinantes como por ejemplo la polaridad, el crecimiento y la migración neuronal. El proceso de nucleación de los microtúbulos neuronales tiene lugar en los centrómeros, de dónde son rápidamente liberados por la acción de la **Katanina** (proteína fragmentadora) (Ahmad et al., 1999, Karabay et al., 2004, Yu et al., 2005) y transportados como pequeños polímeros a neuritas y axones mediante motores moleculares, las Dineinas y Kinesinas (Vale, 2003, Baas and Buster, 2004). Algunos estudios demuestran que la formación del axón viene precedida por una mayor tasa de microtúbulos estabilizados en una dendrita (mayor número de tubulinas destirosinadas y tubulinas acetiladas) (Gonzalez-Billault et al., 2001, Witte et al., 2008). Una de las proteínas clave para la formación del axón, altamente expresada en su extremo y necesaria para el ensamblaje de las tubulinas es la proteína **CRMP2** (del inglés, *Collapsin Response Mediator Protein-2*), de la cual hablaremos en detalle más adelante (Gu and Ihara, 2000, Inagaki et al., 2001, Nishimura et al., 2003).

Los crecientes conocimientos sobre la dinámica microtubular sugerían que ésta y las moléculas encargadas de su regulación, eran los pilares básicos, y por tanto, dianas principales, de la señalización involucrada en polarización y crecimiento axonal entre otros. Hasta el momento se han descrito un gran número de moléculas que se encargan de manera precisa de regular o controlar de manera espacio/temporal esta dinámica microtubular.

Proteínas fragmentadoras y desestabilizadoras. Proteínas implicadas en la remodelación y desestabilización neuronal de los microtúbulos durante el crecimiento axonal. La **Katanina** y la **Espastina**, proteínas fragmentadoras que favorecen la ramificación (Errico et al.,

2004, Yu et al., 2008b). En el grupo de proteínas desestabilizadoras destaca la **Estatmina** (Grenningloh et al., 2004). Todas estas proteínas están presentes, en axones, neuritas, zonas de crecimiento y ramificación e incluso en el cono de crecimiento (Grenningloh et al., 2004, Yu et al., 2008b) (Figura 16).

Proteínas MAP estructurales. Las primeras proteínas implicadas en la regulación de la organización dinámica microtubular y polarización neuronal fueron, la proteína asociada a microtúbulos 1B (**MAP1B**) y **Tau** (Caceres and Kosik, 1990, Caceres et al., 1992, Harada et al., 1994). A pesar de la controversia inicial de los primeros estudios, se llegó a un consenso en el que se determinó que tanto MAP1B como Tau son requeridas para la formación axonal, y que existe cierta redundancia entre ellas (DiTella et al., 1996, Takei et al., 2000). Además de las proteínas MAP clásicas, en los últimos años se han descrito otras proteínas que contribuyen a la remodelación del citoesqueleto microtubular, como la proteína **CRMP-2**, citada anteriormente (Gu and Ihara, 2000).

CRMP-2/CRMP-4. Fosfoproteínas citosólicas miembros de la familia CRMP/TOAD/Uiip/DRP. CRMP-2 y CRMP-4 forman parte del conjunto de 5 isoformas descritas hasta el momento (CRMP1-5). De ellas, CRMP-2 fue inicialmente involucrada en diferenciación y guía axonal (Goshima et al., 1995, Minturn et al., 1995, Quinn et al., 1999, Fukada et al., 2000, Inatome et al., 2000). Además de su función en crecimiento y guía axonal, algunas de estas proteínas también están implicadas en la regeneración, apoptosis, polaridad neuronal y migración celular (Suzuki et al., 2003, Zhang et al., 2007, Hou et al., 2008).

CRMP-2 mediaría el colapso axonal inducido por semaforinas en pollo, así como en conos axonales de DRGs expuestos a ácido lisofosfatídico; (Goshima et al., 1995, Arimura et al., 2000), y estaría involucrada en la regulación del colapso axonal mediado por las MAIs, y cuya fosforilación se ha descrito esta inducida por un mecanismo Rho quinasa dependiente tras estimulación con MAG y Nogo-66 (Mimura et al., 2006). Estudios de interacción han descrito que CRMP-2 se une directamente a la Dineína

citoplasmática y que interfiere con su actividad, influenciando en la formación axonal y desarrollo neuronal (Arimura et al., 2009). La fosforilación de la misma por ROCK, la quinasa dependiente de ciclina (Cdk5) y la quinasa de la glucógeno sintasa β (GSK3 β) como efecto de MAG, Nogo-66, Sema3A y EfrinaA5, produce el arresto del crecimiento y colapso axonal (Arimura et al., 2005, Mimura et al., 2006).

Con respecto a CRMP-4, recientemente también se ha descrito su función como regulador de la inhibición del crecimiento axonal (Alabed et al., 2010).

El papel de las CRMPs en el sistema nervioso lesionado no ha sido muy estudiado; sin embargo, muchos de sus miembros incrementan sus niveles de mRNA o de expresión en tejido nervioso adulto después de lesión, sugiriendo un papel más general de estas proteínas en la respuesta neuronal a lesión (Minturn et al., 1995, Suzuki et al., 2003, Zhang et al., 2007).

MAP1B. Proteína perteneciente a la familia MAP1 y primera de las MAPs en expresarse durante desarrollo del cerebro (Bloom et al., 1985). MAP1B es una proteína de 332 kDa con forma de barril aplanado, con un dominio terminal globular (Sato-Yoshitake et al., 1989) que posee dos cadenas: una cadena pesada (HC, del inglés *Heavy Chain*) de 300 kDa y una ligera (LC, del inglés *Light Chain*) de 32 kDa (Hammarback et al., 1991), que se encuentran codificadas en un solo gen y que se forman mediante proteólisis (Halpain and Dehmelt, 2006) (Figura 17).

Las MAPs fueron descubiertas y caracterizadas debido a su habilidad de unirse a los microtúbulos (Sato-Yoshitake et

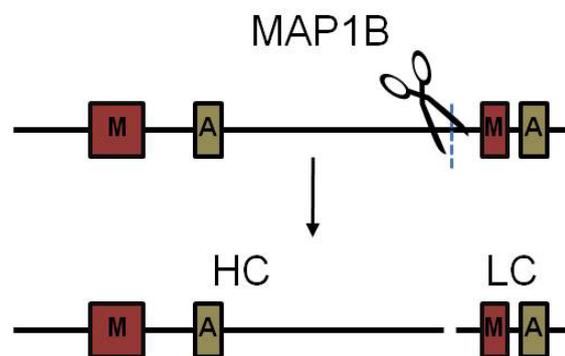


Figura 17. Representación esquemática de la organización y procesamiento posttranscripcional de la proteína MAP1B. Adaptado de Halpain et al. 2006.

al., 1989). Estudios realizados *in vitro* han mostrado que la capacidad estabilizadora de microtúbulos de MAP1B es menor que las de otras

MAPs encontradas en cerebro (Vandecandelaere et al., 1996). En parte esto podría deberse al hecho de que MAP1B puede ser fosforilada de forma diferencial (Ulloa et al., 1993a, Ulloa et al., 1993b) tanto por proteínas quinasas dirigidas por prolina (PDPK) como Cdk5 y GSK3 (Pigino et al., 1997, Goold et al., 1999), como por proteínas quinasas no dirigidas por prolina (NPDPK) como la CKII (Ulloa et al., 1993a).

Con respecto a su papel en regeneración se sabe que su expresión correlaciona tanto espacial como temporalmente con la regeneración en SNP adulto lesionado (Ma et al., 1999, Ramon-Cueto and Avila, 1999). Además, después de lesión también se produce un incremento transitorio de su expresión y de su forma fosforilada en axones de nervio coclear, en lesión parcial de nervio óptico de rata o pez (Book et al., 1996, Vecino and Avila, 2001, Dieterich et al., 2002) y en regiones corticales, talámicas e hipocámpicas de ratas adultas 24h después de TBI; probablemente debido a la conversión del citoesqueleto, de estructura estable a una dinámica (Emery et al., 2000).

Tau. Proteína de la familia MAP2/Tau. Encontramos 6 isoformas en el cerebro humano adulto formadas a partir del *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10 del mRNA del gen que codifica para la proteína Tau (Billingsley and Kincaid, 1997, Tolnay and Probst, 2003). Tau presenta dominios de unión a microtúbulos que están formados por regiones de unión a la tubulina, altamente conservadas y situadas en el extremo C-terminal de la proteína; a continuación se encuentra una región rica en prolinas y finalmente el extremo N-terminal. En cerebro, las isoformas más pequeñas de Tau (50-65 kDa) se expresan de manera diferencial durante el desarrollo (Goedert et al., 1989, Kosik et al., 1989). Poco después de la formación del axón en neuronas de corteza e hipocampo en desarrollo, Tau se va segregando gradualmente, mientras que la MAP2 lo hace hacia las dendritas hecho que posiblemente explica porqué en las neuronas maduras la presencia de Tau está restringida a los axones (Matus, 1990, Dehmelt and Halpain, 2005) (Figura 18). En condiciones normales, la proteína Tau facilita el ensamblaje de la tubulina, estabilizando la organización de los microtúbulos, lo que permite el mantenimiento de los

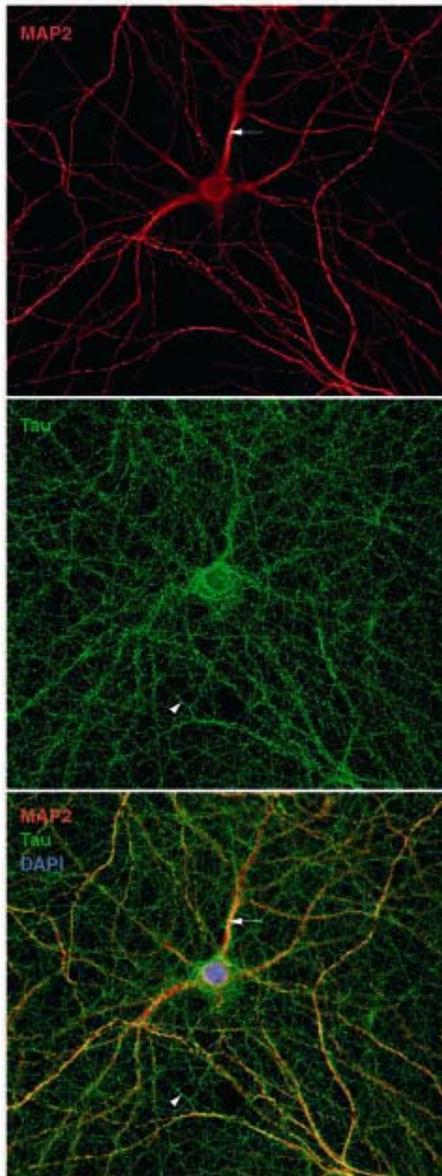


Figura 18. Neurona madura de hipocampo de rata mostrando la diferencia en la distribución de MAP2 y Tau. MAP2 se encuentra principalmente en dendritas (flechas), mientras que Tau lo hace en axones (puntas de fleche). *Adaptado de Dehmelt et al. 2002.*

axones neuronales (Weingarten et al., 1975). Cuando la proteína Tau está hiperfosforilada, se produce un cambio conformacional en la molécula que impide su unión a los microtúbulos, desestabilizándolos y favoreciendo la agregación de dicha proteína (Goux, 2002) (Figura 19).

El proceso de fosforilación no sólo es importante en la aparición de tautopatías sino que también es necesario en condiciones normales para permitir la unión de la proteína Tau a los microtúbulos (Garcia and Jay, 2004). La fosforilación de Tau se produce en residuos de serina o treonina. La fosforilación en residuos de serina se produce en la región de unión de Tau a los microtúbulos mientras que la fosforilación en residuos de treonina no afecta a esta región de unión (Watanabe et al., 1993). *In vitro* e *in vivo* la proteína Tau puede ser fosforilada por una gran variedad de quinasas tales como: quinasas asociadas al estrés (SAPK/JUNK), proteína quinasa dependiente de adenosín 3',5'-

monofosfato cíclico (AMPC) (PKA), proteína quinasa dependiente de calcio (PKC), calmodulina, GSK3 β y CDK5, quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), quinasa reguladora de la afinidad a microtúbulos (MARK) (Ferrer et al., 2005, Hebert et al., 2010).

Así como en el caso de MAP1B y las proteínas CRMPs se ha descrito una relación directa de las mismas con procesos regenerativos, hasta la fecha

no se tienen evidencias importantes de la implicación de Tau en regeneración neuronal. Por lo tanto es fácil hipotetizar sobre la posible implicación de Tau este proceso (presente trabajo).

Quinasas. Las proteínas MAPs están reguladas a nivel post-traducciona por fosforilación a través de quinasas como ERK1/2, GSK3 β y Cdk5 entre otras. Debido al creciente número de quinasas implicadas en la modulación final del citoesqueleto microtubular y la imposibilidad de tratarlas todas aquí solamente explicaremos en detalle las que han sido motivo de nuestros estudios.

ERK1/2. ERK1 (del inglés, *Extracellular-signal Regulated Kinase*), conocida también como proteína quinasa activada por mitógeno p44, y ERK2 (p42 MAP Kinase), proteínas muy relacionadas entre sí que poseen un 85% de identidad, y una identidad mayor en las regiones que participan en su unión a sustrato (Boulton et al., 1990, Boulton et al., 1991, Pearson et al., 2001). Consideradas como una única quinasa conjunta en la gran mayoría de estudios, incluida esta tesis. Perteneciente a la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), familia de quinasas que transducen señales desde la membrana celular al núcleo en respuesta a un amplio rango de estímulos, incluido el stress (Wada and Penninger, 2004, Fang and Richardson, 2005, Kolch, 2005). La ERK1/2 es una serina/treonina quinasas que, tras estimulación, fosforila sustratos específicos en residuos de serina y/o treonina.

Ambas proteínas son expresadas de manera ubicua, pero variable según el tejido. Altamente expresadas en neuronas postmitóticas y otros tipos celulares muy diferenciados (Boulton et al., 1991) donde han sido relacionadas con plasticidad sináptica (English and Sweatt, 1996, Grewal et al., 1999, Sweatt, 2001, Adams and Sweatt, 2002, Mazzucchelli et al., 2002). Participan también en la regulación de la dinámica microtubular, un ejemplo de ello es la fosforilación de la proteína Tau en su epítipo AT8 (Ser202/Thr205) (Reszka et al., 1997, Hebert et al., 2010). De forma genérica su forma fosforilada (activa) se ha relacionado con procesos como el crecimiento neurítico, supervivencia neuronal, diferenciación y

regeneración. En referencia a su implicación en regeneración existe bastante controversia al respecto algunos estudios determinan que su actividad se ve incrementada en nervios periféricos lesionados, en ciático en regeneración, células ganglionares de la retina (RGC) o bien en axones del CST después de entrenamiento motor o estimulación con factores neurotróficos como el BDNF; y que este incremento de actividad estaría asociado a un incremento del crecimiento axonal (Sheu et al., 2000, Desbarats et al., 2003, Gao et al., 2003, Oh et al., 2009); mientras, otros estudios no le atribuyen un papel decisivo en regeneración sino en supervivencia (Pernet et al., 2005). Contrariamente a ambos, algunos trabajos la relacionan con el proceso de inhibición del crecimiento axonal desencadenado por las MAIs después de lesión a través de un posible mecanismo de transducción de señal que desencadena el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y que parece ser dependiente de transactivación por el complejo NgR1 (Dashieil et al., 2002, Koprivica et al., 2005).

GSK3. Las proteínas quinasa de la glucógeno sintasa (GSK3) son unas serina/treonina quinasas originariamente identificadas como enzimas clave en la regulación del metabolismo del glucógeno (Woodgett and Cohen, 1984, Wang and Roach, 1993). Existen dos isoformas, GSK3 α y GSK3 β , codificadas por genes diferentes que poseen un 95% de homología en sus dominios quinasa (Ali et al., 2001). La isoforma β es la forma más expresada en el sistema nervioso (Lau et al., 1999). Están involucradas en múltiples procesos durante el desarrollo neuronal como son, neurogénesis, migración, polarización, guía axonal y crecimiento axonal (ver (Hur and Zhou, 2010) para revisión).

GSK3 β está sujeta a múltiples mecanismos de regulación, de los cuales quizás el más importante es su regulación por fosforilación. GSK3 β está regulada positiva y negativamente por diversas quinasas entre las que se incluyen la **PKB/AKT** (del inglés, *Protein kinase B*) y **p38MAPK** (Cross et al., 1995, Kim et al., 2006). Así, mientras que la fosforilación en el residuo tirosina 216 (Tyr216) estimula su actividad, la fosforilación en el residuo

Serina 9 (Ser9) la inhibe (Wang et al., 1994). La familia de las AKT es la que mayoritariamente media la fosforilación en Ser9 (Cross et al., 1995).

La Inhibición local de la señalización de GSK3 β es esencial para la promoción del ensamblaje microtubular en el cono de crecimiento. Sin embargo, otros estudios, sugieren que esta inhibición bloquea el crecimiento axonal. Con el fin de reconciliar estos resultados opuestos Kim et al. ha sugerido que dicha inhibición puede a la vez incrementar e impedir el crecimiento axonal dependiendo de los sustratos involucrados (Kim et al., 2006). De modo interesante, uno de los rasgos de GSK3 β (y en general de todas las isoformas) es que muchos de sus sustratos (*primed substrates*) requieren de una fosforilación previa por otra

quinasa distinta, proceso conocido como *priming*, antes de que puedan ser fosforilados por la GSK3 β ; no obstante, también fosforila sustratos sin este proceso previo (*unprimed substrates*).

Entre los sustratos de GSK3 β que regulan el ensamblaje microtubular se encuentran la APC (*Adenomatosis Polyposis Coli*) y la CRMP2 que son *primed substrates* y cuya fosforilación por parte de GSK3 β suprime su unión a los microtúbulos (Tanaka et al., 1995, Yoshimura et al., 2005) (Figura 19). La inhibición de GSK3 β da lugar a una reducción de la fosforilación de CRMP2 y un incremento del crecimiento axonal (Kim et al., 2006). Por otro lado, otro de sus sustratos, la MAP1B es un *unprimed*

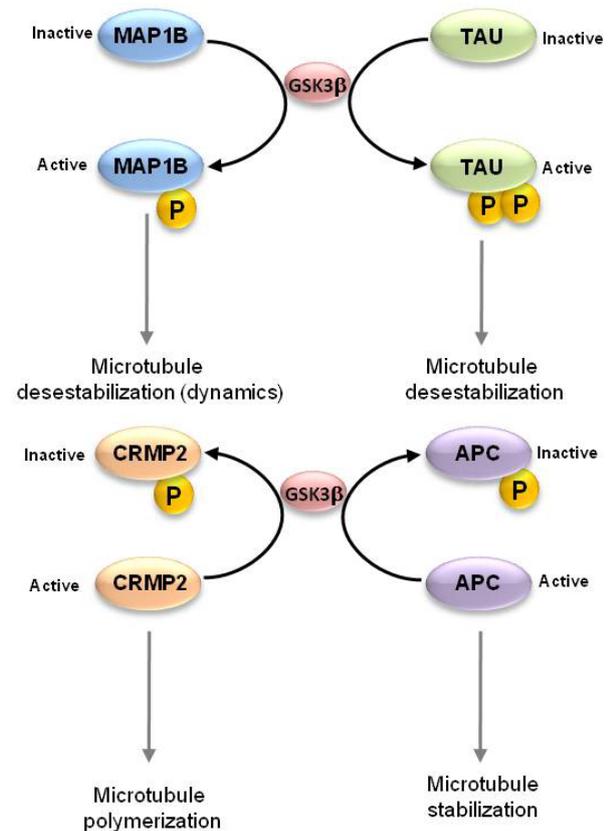


Figura 19. Regulación diferencial de los diferentes sustratos de la GSK3 β .

substrate que puede ser fosforilado por la GSK3 β sin que tenga lugar el proceso de *priming* (Trivedi et al., 2005). La fosforilación de MAP1B incrementa el dinamismo de los microtúbulos, lo que permite la exploración eficiente del espacio intracelular y la respuesta a señales extracelulares, actividades esenciales para el crecimiento y la retracción axonal (Dent and Gertler, 2003, Zhou and Snider, 2005) (Figura 19).

En el caso de la proteína Tau, a pesar de su peculiaridad como sustrato comportándose de manera dual como *primed* o *unprimed substrate* dependiendo del epítipo al que nos referimos (Leroy et al., 2010), parece ser que GSK3 β sería la principal quinasa implicada en su fosforilación (Li et al., 2006).

Todas las características descritas permiten pensar en una posible función de GSK3 β en el proceso general de inhibición de la regeneración axonal y a pesar de la existencia de algunos trabajos al respecto todavía queda mucho por estudiar (Dill et al., 2008, Alabed et al., 2010, Seira et al., 2010)

3.2. Modificaciones transcripcionales

A parte de las modificaciones estructurales que afectan principalmente al citoesqueleto, otra de las modificaciones que tienen lugar después de la activación de la cascada de señalización es la modificación transcripcional. En estudios recientes se ha descrito que la señalización debida a la interacción Nogo66/NgR1 estaría regulando la expresión de factores de expresión claves para el crecimiento normal del axón.

INTRODUCCIÓN IV

Bio-MEMs: Combinando

Microtecnología y Neurobiología

Los **Bio-MEMS** (del inglés, *Biological Microelectromechanical Systems*) se refieren a una clase especial de sistemas donde las muestras orgánicas son manipuladas para analizar y realizar análisis de su actividad en cualquier clase de estudio científico. La estrecha relación entre la **microtecnología** y la biología celular, aunque sorprendente, parece ser algo natural. Las células de mamífero poseen dimensiones aproximadas alrededor de las 10 micras (las neuronas con sus axones y dendritas son más extensas). Para estudiar y manipular células necesitamos herramientas para su observación que posean un rango de dimensiones determinado, y para las que sería de gran utilidad tener estructuras tanto mayores como menores respecto al tamaño celular con las que poder realizar gran variedad de estudios como por ejemplo: estudios del citoesqueleto (Whitesides et al., 2001, Chen et al., 2003), de movilidad celular (Parker et al., 2002, Brock et al., 2003) y por ejemplo en Neurobiología el estudio de la formación de conexiones funcionales (Stenger et al., 1998, Sorribas et al., 1999, Sorribas et al., 2002, Romanova et al., 2004). Una de las técnicas que hoy en día más se está desarrollando en ese sentido es la de la microfluídica (Figura 20).

El término **microfluídica** se refiere a la microfabricación de dispositivos que utilizan pequeños volúmenes de fluido a través de una serie de canales y cámaras, con tamaños comprendidos entre 1-100 μ m. En la actualidad, la microfluídica se está abriendo paso en el mundo de la Biología de manera muy notable, hecho que la convierte cada vez más en una herramienta de gran utilidad para biólogos celulares y moleculares en relación a los sistemas *in vitro* convencionales debido, a que permite el control preciso, monitoraje y manipulación de los microambientes celulares y el estudio a nivel de una única célula.

Hasta el momento se han descrito diversos dispositivos microfluídicos que se ha visto son útiles para su uso en diferentes aplicaciones biológicas como por ejemplo la separación de proteínas y DNA, la clasificación y manipulación celular, inmunoensayos, *screenings* combinatoriales, la secuenciación de DNA, ensayos enzimáticos y PCR (Sia and Whitesides, 2003).

Una de las mayores ventajas de estos sistemas de ensayo es que permiten la disminución u optimización de muchos de los requerimientos necesarios para el desarrollo de los análisis como pueden ser los reactivos, número de células,

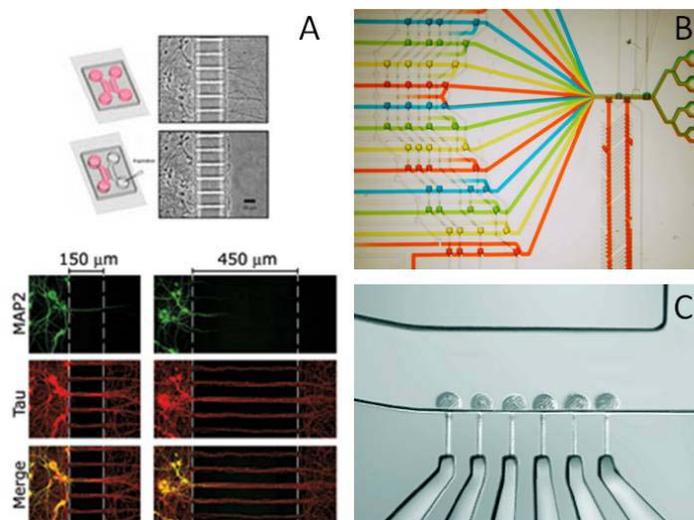


Figura 20. Ejemplos de diferentes usos de los sistemas microfluídicos. A) Dispositivo microfluídico para el estudio de daño, regeneración y transporte en el SNC. B) Sistema de válvulas y microcanales para el control de diferentes flujos (Grupo del Dr. Albert Folch). C) Microdispositivo de registro electrofisiológico múltiple de células individuales en cultivo CollectriconDinaflow®. Adaptado de Taylor et al.2005 y Xie et al.2004.

tiempos de las reacciones, portabilidad, disminución de costes, versatilidad en el diseño y capacidad de integración con otros microdispositivos (Sia and Whitesides, 2003). Muchos de estos diseños ofrecen nuevas aproximaciones para el estudio de la **fisiología celular del sistema nervioso** e incluso la patofisiología de muchas enfermedades neurodegenerativas al permitir el aislamiento de

células, neuritas o sinapsis y el análisis de las respuestas neuronales a las perturbaciones ambientales.

4.1. Litografía blanda (Soft Lithography)

Las técnicas de miniaturización han sido y siguen siendo muy importantes en campos como la microelectrónica, microelectromecánica y **microfluídica**, pero como hemos comentado, estas técnicas tienen cada vez más presencia en campos como la Biología. En el momento en que todos los elementos tienden a

ser miniaturizados, los procesos de fabricación de todos sus componentes se convierten en un reto para los investigadores.

Dentro de la microfluídica, una de las técnicas más frecuentemente utilizadas para la fabricación de moldes es la **Litografía blanda**. Así es como se conoce al conjunto de técnicas que utilizan materiales blandos para realizar moldes y patrones que puedan ser replicados y transferidos nuevamente. Esta técnica se desarrolló originariamente como una alternativa a las técnicas de **fotolitografía** y **litografía por rayo de electrones** del campo de la microelectrónica (Stenger

et al., 1998). El principal problema de estas técnicas es que se han convertido en muy sofisticadas, especializadas, caras y difíciles de utilizar además de poco familiares y demasiado inaccesibles para los biólogos. Por el contrario, la litografía blanda posee mejores características como son su simplicidad, bajo coste, rapidez en la creación de prototipos y facilidad de uso.

El principal componente para el modelaje en el proceso de litografía blanda es el **polidimetilsiloxane (PDMS)** (Furuzono et al., 1993, Furuzono et al., 1996), aunque también podemos utilizar otros polímeros de características similares. Debido a sus atractivas características como: que es blando, transparente, impermeable al agua, biocompatible y tiene una baja conductividad eléctrica, el

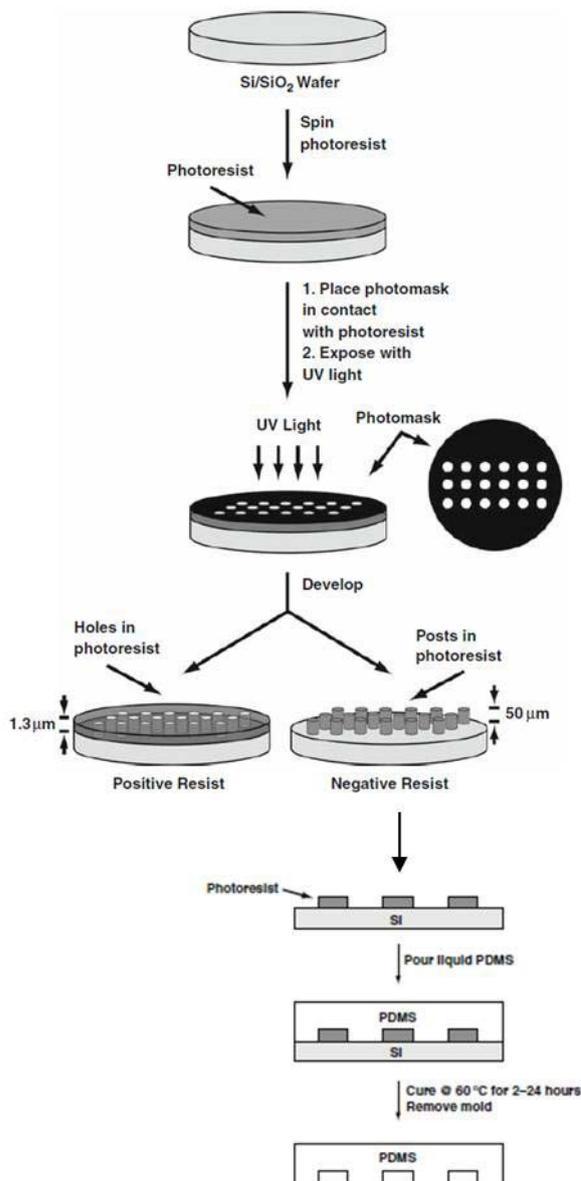


Figura 21. Esquema del proceso de fotolitografía. Si (Silicio) Adaptado de Whitesides et al 2001.

PDMS se ha convertido en el material más usado comúnmente en esta técnica (Ng et al., 2002, Lee et al., 2003, Lee et al., 2004). El bloque puede ser utilizado de formas muy variadas: como “sello”, para crear patrones de moléculas sobre sustratos (Watson et al., 2006, Shestopalov et al., 2010, Xie and Jiang, 2011), o patrones celulares (Mrksich and Whitesides, 1996, Whitesides et al., 2001); como molde, para generar estructuras 3D en un sustrato; o como parte de una gran estructura que puede convertirse en una red de microcanales (Haeberle and Zengerle, 2007). El primer paso de la litografía blanda es la fabricación del **master** o plantilla, para lo cual necesitamos el uso de la litografía convencional (Xia et al., 1999, Whitesides et al., 2001). Normalmente, la base para la fabricación del master está compuesta de Silicio (Si). Después del diseño de los patrones, éstos son impresos en una superficie de plástico o vidrio con metal o tinta, este patrón recibe el nombre de **máscara**. La máscara es entonces transferida sobre una capa de un polímero o **resina fotoreactiva**. La luz UV atravesará únicamente las zonas de la máscara que no han sido impresas y será absorbida por las zonas opacas (Weibel et al., 2005). Con respecto a la resina fotoreactiva, podemos encontrarnos con dos tipos de resina distintos, la resina fotoreactiva podrá ser **positiva**, cuando la región expuesta a la luz es soluble con la solución reveladora; o **negativa** si ésta es insoluble (Figura 21).

Finalmente, el molde o bloque de PDMS se fabrica al depositarlo en forma líquida sobre el master y procesarlo para, posteriormente, conseguir su solidificación y así poder retirarlo del master (proceso denominado, curado) (Figura 21)). A pesar de que para llegar a este punto es necesario el uso de salas blancas y equipos costosos, una vez se obtiene el master, este puede ser utilizado en múltiples ocasiones lo que la hace una técnica muy atractiva en la formación de patrones a nivel micrométrico (Figura 21).

Las características del relieve de los moldes de PDMS pueden, uno por uno, ser fielmente duplicados y mediante el uso de esta estructura como molde se pueden crear nuevas estructuras en una segunda fase de exposición a luz UV y curado. Las segundas réplicas serán complementarias a los moldes y, por tanto, similares al master original (Qian and Wang, 2010, Ashley et al., 2011, Chen et al., 2012).

La utilización de la litografía blanda para la fabricación de microestructuras incrementa cada día más su presencia en muchos campos de la investigación, entre ellos la Neurobiología. Por ejemplo, algunos de los estudios en los que se está utilizando esta técnica son estudios de **regeneración** (Taylor et al., 2005, Vahidi et al., 2008, Ben-Yakar et al., 2009, Kim et al., 2009) y estudios de **electrofisiología** (Morales et al., 2008b, Berdichevsky et al., 2009, Park et al., 2009, Blake et al., 2010), en los que en combinación con otras técnicas parece haberse convertido en una técnica muy prometedora.

4.2. Fundamentos de la E²dish[®] Technology

Una de las principales características de la membrana plasmática celular es su permeabilidad selectiva, permitiendo el paso selectivo de moléculas como por ejemplo los iones (ej. Na⁺, K⁺, Ca⁺ y Cl⁻); y que será esencial para el mantenimiento del equilibrio entre los medios intra y extracelular. El transporte de estos iones se lleva a cabo a través de los canales iónicos.

Los canales iónicos juegan un papel vital en la transducción de señales en las neuronas, liberación de neurotransmisores, contracción muscular y secreción celular entre muchos otros. Su actividad puede ser registrada mediante el registro del potencial de membrana, el potencial de acción (AP) extracelular, el flujo iónico y la técnica de *patch-clamp* (Sigworth and Klemic, 2005). Los potenciales de membrana reflejan la actividad de los canales iónicos y pueden ser medidos de forma directa mediante el uso de microelectrodos y micropipetas de vidrio llenas de salino que atraviesan la célula. Los potenciales de acción (APs) de las neuronas pueden ser detectados también mediante **electrodos extracelulares**. Los principios biofísicos de la excitación neuronal han sido bien definidos y establecidos para poder explicar los potenciales extracelulares detectados por estos electrodos (Nunez, 1981a, b, Holt and Koch, 1999). En este caso las señales registradas serán menores, 1mV de amplitud, y dependerá además de las corrientes extracelulares. A pesar de que con el registro de los APs extracelulares se obtiene una menor información que con los potenciales de membrana, los microelectrodos extracelulares son útiles para el registro de los APs de **poblaciones celulares** y secciones de tejido (Claverol-Tinture and Pine, 2002, Claverol-Tinture et al., 2005, Melani et al.,

2005, Claverol-Tinture et al., 2007). Es evidente que estas técnicas nunca llegaran a substituir completamente las técnicas tradicionales de *patch-clamp*, lo que se pretende con estas nuevas aproximaciones es desarrollar nuevas técnicas para realizar registros eléctricos de células de manera mucho más sencilla y para, por ejemplo, su posible aplicación en procesos de *screening* farmacológicos.

La tecnología E²dish[®] es una nueva tecnología que pretende conseguir la simplificación de la electrofisiología en neuronas en cultivo, hacer que sea económica y que posea un alto rendimiento, sobre todo, con respecto a su utilización en *screening* farmacológico. Durante el desarrollo de esta tesis tuvimos la oportunidad de colaborar con el grupo del Dr. Enric Claverol, grupo que la había desarrollado.

Con esta nueva técnica se consigue el registro electrofisiológico *in vitro* de

cultivos de neuronas del hipocampo mediante la combinación de sistemas de microfluídica y registro electrofisiológico de potenciales de campo ((Morales et al., 2008b)/Aleria Biodevices).

La tecnología E²dish[®] implica la utilización de placas de cultivo a las que se integrará un bloque de PDMS con un microcanal que a su vez actuará de micropipeta. Este sistema puede ser considerado como un registro del tipo *loose patch clamp* capaz de registrar corrientes y potenciales de neuronas en cultivo y es además compatible con la instrumentación necesaria para la electrofisiología más convencional. La geometría apropiada del microcanal y de

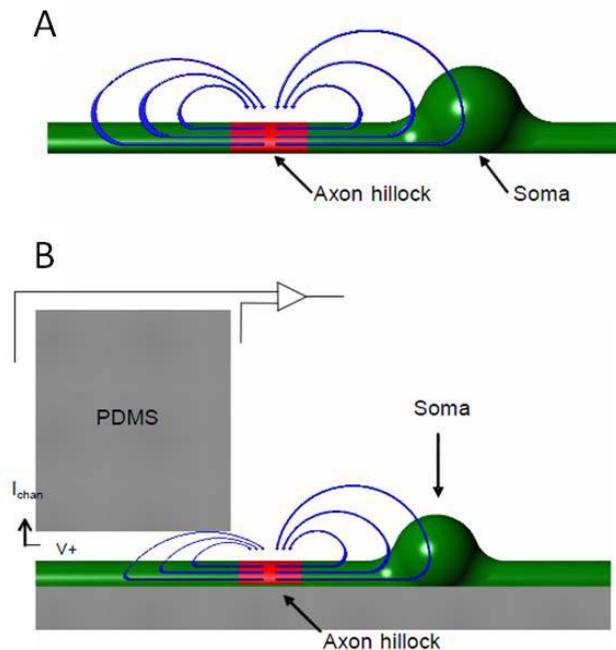


Figura 22. Esquema de una neurona de hipocampo en cultivo. A) Representación del segmento inicial del axón que produce corrientes extracelulares de forma libre. B) Corrientes extracelulares del segmento inicial del axón en una neurona confinada en un microcanal. Adaptado de Morales et al. 2009.

la estructura de PDMS favorece el crecimiento de axones de forma espontánea al interior del microcanal. Las neuritas confinadas en su interior y sus corrientes extracelulares permiten el registro de potenciales eléctricos en las cámaras a través de macroelectrodos reutilizables, evitando la necesidad de la microfabricación y la integración de los microelectrodos en un sustrato (para más detalle del proceso de fabricación ver Material y Métodos) (Figura 22).

La actividad eléctrica neuronal, como hemos comentado en apartados anteriores, está directamente asociada con el flujo transmembrana de iones a través de los canales iónicos, especialmente en la región conocida como montículo o segmento inicial del axón (del inglés, **axon hillock**), que en cuestión de milisegundos dará lugar a una despolarización y posterior hiperpolarización de la

membrana plasmática (> 60 mV) (Goldman, 1943, Hodgkin and Katz, 1949, Adams and Gage, 1979, Clay, 1985). Las curvas de corriente asociadas se extenderán pasivamente a lo

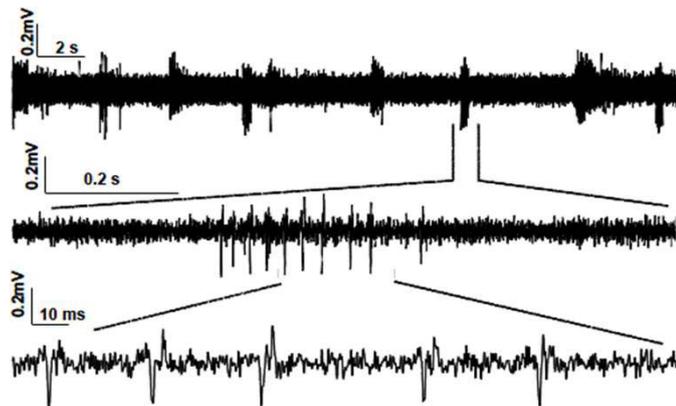


Figura 23. Registro de la actividad tipo *bursting* de neuronas de hipocampo mediante amplificadores de fijación de corriente (*current clamp*). Adaptado de Morales et al. 2009.

largo de las neuritas de forma directamente proporcional a la **longitud electrotónica** (λ).

Los potenciales de acción (APs) extracelulares de los axones confinados en el microcanal darán lugar a **potenciales eléctricos momentáneos** entre las dos cámaras unidas por el microcanal (V_{ap}) (microvoltios, μV) los cuales serán registrados por macroelectrodos de Ag/AgCl.

El valor del voltaje es estimado entonces a partir de la fórmula $\bar{I}_{ex} \times R_{chan}$, donde \bar{I}_{ex} es la media de la magnitud de la corriente extracelular confinada a lo largo del microcanal (picoamperios, pA) y R_{chan} (megaohms, $M\Omega$) la resistencia entre los extremos del microcanal (Morales et al., 2008b).

Para conseguir valores que puedan ser registrados se necesitan unas medidas concretas del microcanal (en este caso de $25 \mu\text{m} \times 3.7 \mu\text{m}$); medidas que permitan el crecimiento de axones en su interior ($\sim 1 \mu\text{m}$ diámetro), retengan los somas celulares en el exterior y logren una resistencia $R_{chan} = 10\text{-}20 \text{ M}\Omega$ (canal de 1 mm de longitud) (Morales et al., 2008b). El voltaje resultante alcanzará valores de entre 10 y 100 mV (varios órdenes de magnitud menos que el registro de los APs intracelulares).

La actividad registrada, tanto con amplificadores *voltage clamp* (fijación de voltaje), *current clamp* (fijación de corriente) como con amplificadores extracelulares, muestra patrones que coinciden con los que se han descrito para los cultivos monocapa de neuronas de hipocampo en los MEAs (del inglés, *Micro-Electron Arrays*) convencionales; en los cuales se observa una actividad sináptica neuronal espontánea tipo *bursting* de Potenciales Postsinápticos Excitatorios (PPSEs) (Soussou et al., 2007, Morales et al., 2008b) (Figura 23). Además, de manera similar al caso de los MEAs, este nuevo sistema permite el registro de la actividad que proviene de múltiples neuronas (Morales et al., 2008b).

Los resultados obtenidos gracias a este nuevo sistema de registro se mostrarán y discutirán en los apartados de resultados y discusión respectivamente.

OBJETIVOS

La presente tesis doctoral tiene dos objetivos principales: en primer lugar determinar el papel de la quinasa GSK3 β en la vía de señalización desencadenada por los Inhibidores Asociados a la Mielina (MAIs) que inhibe el crecimiento axonal, y en segundo lugar, estudiar las posibles funciones no asociadas a la inhibición mediada por mielina de la proteína OMgp.

Objetivos concretos:

1. Estudio, a corto y largo plazo, del estado de actividad de las quinasas ERK1/2 y GSK3 β tras estimulación con MAIs en Neuronas Granulares del Cerebelo (CGNs) de ratón.
2. Estudio, a corto y largo plazo, del estado de actividad de las quinasas ERK1/2 y GSK3 β tras axotomía de la vía Entorrino-Hipocámpica en cultivos organotípicos de ratón.
3. Análisis del papel de NgR1 en relación con la actividad de las quinasas ERK1/2 y GSK3 β .
4. Evaluación del grado de regeneración axonal en CGNs estimuladas con MAIs o en cultivos de la vía Entorrino-Hipocámpica axotomizados tras el tratamiento con drogas que bloquean la actividad ERK1/2 y GSK3 β .
5. Determinar la posible participación de OMgp en la transmisión sináptica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron para el conjunto de experimentos ratones OF1 (Iffa Credo, Lyon, France). El día de apareamiento se consideró como día embrionario 0.5 (E0.5) y el día después del nacimiento se consideró día post-natal 0 (P0). Además de los animales salvajes utilizamos ratonas embarazadas de la cepa mutante *NgR*^{-/-} (Zheng et al., 2005). Los animales se utilizaron en edades comprendidas entre P5-P7 para los cultivos de CGN, entre P0-P1 para los cultivos organotípicos Entorrino-Hipocámpicos y en estado embrionario E15.5 para los cultivos de neuronas de hipocampo. Por otro lado se utilizaron ratas Sprague-Dawley para la obtención de la mielina purificada.

Obtención de mielina y medios condicionados

La mielina fue aislada tal y como se describe en el protocolo original de Norton y Poduslo (Norton and Poduslo, 1973). De una manera rápida, los cerebros de ratas Sprague-Dawley fueron homogenizados en una solución de sacarosa 0.32M a 4°C en un homogenizador Dounce. El homogenado obtenido fue colocado sobre una solución de sacarosa 0.85 M y centrifugado a 75.000 g durante 30 minutos. La mielina que apareció en la interfase, entre las dos soluciones, fue recolectada en agua destilada y centrifugada de nuevo a 75.000 g durante 15 minutos. El pellet resultante fue resuspendido en agua y centrifugado de nuevo a 12.000 g durante 10 minutos (x2). El pellet blanco obtenido fue resuspendido de nuevo en sacarosa 0.32 M y se repitió el proceso como en el primero de los gradientes realizados. Finalmente, la mielina obtenida se lavó en agua a 75.000 g durante 10 minutos (x2) para eliminar los restos de sacarosa. El pellet final fue liofilizado y el contenido proteico fue cuantificado mediante el ensayo del BCA (Pierce, Rockford, IL). Para determinar la

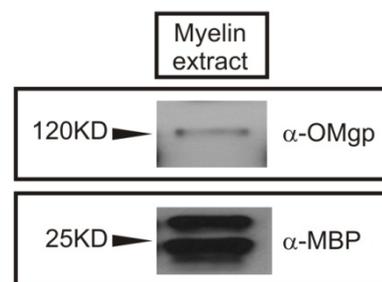


Figura 1. Detección de OMgp y MBP por Western Blot en extractos de mielina de rata.

presencia de proteínas inhibitorias derivadas de la mielina se realizo un western blot detectando la presencia de OMgp y *myelin binding protein* (MBP) (Figura 1)

Para la obtención del medio condicionados AP-Nogo66, las células COS1 fueron transfectadas con el vector pAPtag-5-Nogo-66 (generosamente cedido por el Profesor Z. He, Harvard Medical School, Longwood Avenue, MA, USA) y cultivadas en medio OPTIMEM™. Pasadas 48 horas el sobrenadante que contenía el AP-Nogo66 fue concentrado 10 veces utilizando los filtros de centrifugación Amicon Ultra-4 de 30.000 NMWL (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA). En paralelo otros cultivos fueron transfectados con el vector vacío (*Mock-transfected*) a modo de control.

Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos empleados fueron usados a una dilución 1:1000 menos en caso de que se indique lo contrario. CS-56 (1:200) y Tubulina (1:10.000) de Sigma (St. Louis, MO, USA). GSK3 β fosfo-Serina 9 (1:250), GSK3 fosfo-Y279/Y216 (1:500), GSK3 β total y Lingo-1 de Upstate (Lake Placid, NY). AKT fosfo-serina 473 y ERK fosfo-treonina 202/fosfo-tirosina 204 de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). ERK total y AKT total de *Transduction Laboratories* (Lexington, KY) y Santa Cruz Biotechnology respectivamente. Los anticuerpos monoclonales contra Actina (1:10.000) y MBP fueron adquiridos en Chemicon (Temecula, CA, USA). OMgp de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Tau total (Tau5) en Biosource Europe, S.A. (Nivelles, Belgium) y Tau fosfo-serina 202-205 (AT8, 1:250) fue amablemente cedido por el Prof. Jesús Ávila (CBM-UAM, CSIC, Madrid). En el caso de p75 el anticuerpo se obtuvo en Promega (Madison, WI, USA). Finalmente, los anticuerpos contra Cofilina fosfo-serina 3 y Cofilina total, el MAP1B (SMI-31) (1:500) y el Nogo Receptor 1 (N20) (1:250) fueron obtenidos de Cell Signalling (Beverly, MA), Covance (Emeryville, CA) y de Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA) respectivamente. La Faloidina-FITC y el Hoechst (Bisbenzimidaz) fueron adquiridos en Sigma. Los Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 468 lo fueron en Molecular Probes (Leiden,

Netherlands). Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) se obtuvieron en DAKO (Glostrup, Denmark).

El inhibidor de la kinasa ERK1/2, U0126 se adquirió en Promega mientras que los inhibidores de la GSK3 β , SB-415286 y SB-216763 en Sigma. Además la isoforma permeable de la C3 transferasa (TAT-C3) y el péptido antagonista Nogo66 (1-40) (NEP1-40) adquiridos en Cytoskeleton (Denver, CO, USA) y Alpha Diagnostics (San Antonio, TX, USA) respectivamente. El Ácido Okadaico (OA) se obtuvo de Promega (San Antonio, TX, USA).

Western blot

Los cultivos neuronales así como los de HEK293 se recogieron en tampón de lisis (ácido 4-2 hidroxietil-1piperazin etanosulfónico 50mM pH7.5, 150 mM cloruro sódico, 1.5 mM cloruro de magnesio, 1 mM ácido etilenglicol-bis- (2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra-acético, 10% glicerol y 1% tritón X-100) que a su vez contenía un coctel inhibidor de proteasas (Roche) y fosfatasas (10 mM pirofosfato de tetrasodio, 200 μ M ortovanadato sódico y 10 mM fluoruro sódico). Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 16.000 xg durante 20 minutos descartándose el pellet. Las muestras fueron hervidas en tampón Laemmli y separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida 8-12%. Tras la separación las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa durante 12 horas. Las membranas se bloquearon con una solución de tampón tris-salino (TBST) 0.1 M más un 5% de leche desnatada pH7.4 durante 2 horas e incubadas toda la noche en la misma solución con los anticuerpos primarios correspondientes. Después de la incubación con los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa las membranas se revelaron con ECL-plus (Amersham-Pharmacia Biotech GE Helathcare, Barcelona, ES).

Experimentos *in vitro*

Las neuronas granulares del cerebelo provenientes de crías de ratón P5-P7 de camadas *NgR*^{+/+} o *NgR*^{-/-}, fueron disociadas por tripsinización tal y como

previamente había sido descrito (Niederost et al., 2002). Las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark) sobre cubreobjetos previamente coatinizados y se dejaron crecer durante un periodo de 24-48 horas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con N2 y B27. Se utilizaron dos procedimientos diferentes para los tratamientos de las neuronas: i) los cubreobjetos fueron recubiertos con la mielina purificada como en otros trabajos (Fournier et al., 2001) y ii) tratamientos agudos con mielina o AP-Nogo66. Los cultivos fueron marcados con faloidina y bisbenzimidida, montados en Fluoromount™ (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) y analizados por microscopia confocal (TCS SPII, Leica, Bannockburn, IL, USA). La longitud neurítica en los cultivos fue valorada con el programa ImageJ.

Los cultivos de hipocampo de animales salvajes fueron también expuestos al medio condicionado AP-Nogo66 de manera aguda.

En el caso del cultivo de células HEK293, después de alcanzar una confluencia del 70-80% éstas fueron transfectadas con NgR1 (vector amablemente cedido por el Prof. Marc-Tessier Lavigne, Genentech, CA) o bien combinando este último con p75 (vector cedido por el Prof. Moses Chao, New York, NY); utilizando Lipofectamine-Plus reagent (GIBCO Life Technologies, Merelbeke, Belgium). Al día siguiente, después de los tratamientos, las células previamente transfectadas fueron procesadas bioquímicamente para Western blot.

Tecnología E² dish

Con el fin de analizar el posible efecto de la proteína OMgp en la transmisión sináptica, utilizamos un dispositivo desarrollado recientemente (Morales et al., 2008a) (ver apartado IV de la Introducción para más detalles). La fabricación de los dispositivos se realizó mediante fotolitografía blanda en la que se utilizó el Polidimetilsiloxano (PDMS). El dispositivo compuesto por lo tanto de PDMS, contiene a su vez dos cámaras paralelas (6 mm de diámetro) y un microcanal (25mm x 3.7 mm x 1mm). El sistema de registro consta de dos electrodos de cloruro de plata que son sumergidos en el medio extracelular que contienen

ambas cámaras y donde han sido cultivadas las neuronas del hipocampo. El medio extracelular tiene propiedades eléctricas como conductor y permite la formación de un circuito cerrado de un electrodo al otro a través del microcanal. Mientras que los somas neuronales quedan retenidos en las cámaras, únicamente sus procesos neuronales pueden atravesar y extenderse a través del microcanal desarrollando corrientes eléctricas confinadas dentro del microcanal y potenciales cámara a cámara asociados a la actividad neuronal espontánea o estimulada (Morales et al., 2008a). Las placas para el cultivo celular fueron recubiertas con Poly-D-lisina, posteriormente los cultivos disociados de neuronas de hipocampo de ratones E15.5 fueron cultivadas en las cámaras a una densidad comprendida entre las 60.000 y 100.000 células por cámara para garantizar que alguna de las neuritas era capaz de crecer dentro del canal. Las neuronas. Las neuronas fueron mantenidas en cultivo durante 10-12 días *in vitro* en Neurobasal suplementado con B27 (GIBCO Life Technologies). Además pasadas 24 horas se añadió al medio citosina b-arabino furanoside ($1\mu\text{M}$) (Sigma) para inhibir la proliferación glial. Después del tratamiento, la mayoría de precursores gliales y otras células proliferativas fueron eliminadas constituyéndose un cultivo en el que más del 95% de las células presentes eran neuronas. A partir de ese momento los cultivos fueron estimulados y registrados con amplificadores tradicionales de *patch-clamp* (2400 AM-Systems) o bien amplificadores extracelulares convencionales (Multichannel Systems). La actividad basal de los cultivos fue registrada durante 5 minutos. Pasado ese tiempo los cultivos fueron estimulados con tampón PBS-BSA (PBS 0.1M + 0.1% BSA), tampón en el que la proteína recombinante OMgp (R&D Systems, 1674-MG) fue resuspendida (control negativo). Una vez registrado el control negativo, el medio fue cambiado por un medio que contenía la proteína recombinante a una concentración $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en ambas cámaras. Después del registro algunos de los dispositivos fueron tratados con tetrodotoxina (TTX) (Tocris Bioscience, Bristol, UK) ($1\mu\text{M}$) para bloquear la transmisión de la actividad sináptica. Todos los datos fueron analizados (gráficos y contajes de *spikes*) con el programa MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA). Se analizaron un total de 25 dispositivos. En los experimentos la actividad sináptica de las neuronas fue medida desde los 80

segundos a los 5 minutos en cada condición experimental. Algunos de los cultivos fueron tratados con NEP1-40, antagonista del NgR1, previa la incubación con OMgp.

Determinación de la actividad GSK3 β y ERK1/2

Los ensayos de actividad de ambas quinasas fueron llevados a cabo tal y como ha sido descrito previamente (Sayas et al., 1999, Simo et al., 2007). Después del tratamiento con el extracto de mielina se recolectó el extracto celular en tampón de lisis (20 mM HEPES (pH 7.4) 100 mM NaCl, 100 mM NaF, 1 mM sodio orthovanadato y 5 mM EDTA). La fracción soluble fue inmunoprecipitada con bolas de agarosa conjugadas con anticuerpos contra GSK3 o ERK1/2. Se utilizaron 10 μ l de muestra para incubarlos con un tampón que contenía 25 mM HEPES (pH 7.5), 1 Mm dithiothreitol, 10mM MgCl₂ y un péptido sustrato específico de GSK3 (pGSK3 PEPTIDE-2, Upstate Biotechnology Inc.) a una concentración de 0.75 mg/ml y en presencia de γ^{32} P-ATP. Pasada una 1 hora de incubación se paró la reacción con 1% H₃PO₄ y los productos de la reacción fueron transferidos a membranas de Immobilion. La diferencia entre la actividad quinasa en presencia o ausencia del LiCl, inhibidor de GSK3 (20 mM) fue considerada reflejo de la actividad de la GSK3 β .

En el caso de la quinasa ERK1/2, las reacciones fueron iniciadas mediante la resuspensión de las muestras inmunoprecipitadas en un tampón específico (25 mM Tris–Cl [pH 7.4], 5 mM α -glycerophosphato, 2 mM dithiothreitol, 0.1 mM Na₃VO₄, 10 mM MgCl₂, y 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) que contenía 20 μ M de adenosina trifosfato no marcada, 5 μ Ci de γ^{32} P-ATP y 5 μ g de MBP (Sigma) como sustrato de la quinasa.

Las reacciones fueron incubadas a 30°C durante 1 hora. Las membranas con el 32 P-GSK3 peptie-2 y el 32 P-MBP se secaron y fueron expuestas durante toda la noche a una pantalla de fosfo-imágenes (Fuji Photo Film Co. Ltd, Tokyo, Japan). Los niveles de radioactividad fueron cuantificados utilizando una el Fuji BAS1000 fosfo-imágenes y el software PCBAS 2.0 (Fuji).

Cultivos organotípicos Entorrino-Hipocámpicos

Los cultivos organotípicos fueron obtenidos a partir de ratones NgR^{+/+} o NgR^{-/-} de edades entre P0 a P1 tal y como había sido descrito (del Rio et al., 2002, del Rio and Soriano, 2010). Los animales fueron anestesiados por hipotermia, sus cerebros extraídos asépticamente y el hipocampo y la corteza entorrinal diseccionados. Mediante el uso de un *chopper* McIlwain, los trozos de tejido fueron cortados en secciones únicas horizontales (300-400 μm de grosor) conteniendo las mismas ambos, hipocampo y corteza entorrinal y mantenidos en medio de disección (MEM suplementado con glutamina (2 mM)) durante 45 minutos a 4°C. Posteriormente, las secciones seleccionadas fueron cultivadas utilizando el sistema de membranas de interfase (Stoppini et al., 1991). Las secciones se colocaron en membranas estériles de 30 mm \varnothing (Millicel-CM, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) y colocadas luego en una placa de cultivos de seis pozos. Se colocó 1ml de medio de cultivo (50% MEM, 25% NHS, 25% HBSS) suplementado con 2 mM de glutamina y 0.044% de NaHCO₃ ajustado todo a un pH 7.3. Los cultivos se mantuvieron en el incubador a 36° con un 5% CO₂. Pasados 15 días *in vitro*, los cultivos fueron axotomizados.

Axotomía de la vía Entorrino-Hipocámpica *in vitro*, marcaje con biocitina, cuantificación de axones regenerados y microscopia electrónica

Pasados 15 días *in vitro*, la vía Entorrino-Hipocámpica de los cultivos organotípicos de animales NgR^{1+/+} y NgR^{1-/-}, fue axotomizada cortando desde la fisura rinal hasta la zona ventricular con una aguja de tungsteno a lo largo de la delimitación Entorrino-Hipocámpica. Todo el proceso de axotomía fue realizado bajo lupa. (del Rio et al., 2002). Los cultivos se mantuvieron en cultivo después de la lesión por tiempos comprendidos entre los 30 minutos y los 15 días, pasado ese tiempo fueron procesados para estudios bioquímicos y morfológicos. De forma paralela otros cultivos fueron tratados farmacológicamente con inhibidores de GSK3 β , SB-415286 y SB-216763, NEP1-40 o C3-transferasa durante 10 días, determinando el nivel de regeneración de la vía gracias al marcaje con biocitina. Para la realización del marcaje con biocitina se colocaron dos pequeños cristales (Sigma, Poole,

Dorset, UK)) en la zona entorrinal de la rodaja. Al día siguiente los cultivos se fijaron con una solución de Paraformaldeído al 4%. Una vez fijados se obtuvieron secciones de 50 μm de grosor a partir de las rodajas con el vibrátomo (Leica VT100S, Barcelona, ES). Las secciones que se obtuvieron procesadas para inmunohistoquímica; se incubaron durante toda la noche con el complejo Avidina-Biotina peroxidasa (ABC-elite™) (1:100) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Al día siguiente la actividad peroxidasa se visualizó utilizando la reacción de diaminobenzidina (DAB)-níquel (Del Rio et al., 1997). A partir de ese momento las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados sobre los cuales se colocaron los cubreobjetos con el medio de montaje Eukitt™ (Merck, Darmstadt, Germany). Para la cuantificación, se utilizó un ocular calibrado con el que se contaron el número de axones marcados con biocitina que cruzaban un segmento de 400 μm en el hipocampo a una distancia de 75-80 μm en paralelo a la zona de lesión de las secciones consecutivas de cada co-cultivo (objetivo de 40 aumentos en aceite de inmersión) (Mingorance et al., 2004, Mingorance et al., 2005).

Algunos de los co-cultivos obtenidos de animales *NgR1*^{-/-} fueron revelados con DAB previamente a la obtención de las secciones para poder así ser procesados para la microscopia electrónica. Dichos co-cultivos fueron postfijados en una solución al 2% de tetraóxido de osmio y luego incluidos en Araldita (Gulyas et al., 1993, Del Rio et al., 1997, Mingorance et al., 2006) Las secciones ultra finas se obtuvieron con el ultra micrótomo Leica Ultracut IC6 y la observación de las mismas se llevó a cabo en el microscopio electrónico Tecnai Spirit (FEI Company, Holanda).

Arrays y ontología genética en los co-cultivos de EHP

Para el análisis de *arrays* se diseccionaron de nuevo rodajas de co-cultivos organotípicos de la región Entorrino-Hipocámpica de animales salvajes. Éstos fueron cultivados y axotomizados como previamente se ha descrito en apartados anteriores Material y Métodos. Finalmente, se obtuvo el RNA total de los co-cultivos a las 24 horas (n=20), 3 días (n=20) y 7 días después de lesión (n=20). Un total de 500 ng de RNA fueron marcados utilizando el *Agilent's Low Input RNA Labelling Kit*, con el que conseguimos la transcripción reversa del

mRNA en presencia del primer T7-oligo-dT para sintetizar cDNA, seguidamente le sigue una transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T7 en presencia de Cy3-CTP y Cy5.CTP para producir el cRNA. El cRNA marcado fue hibridado en el *microarray Agilent mouse 44k 60-mer oligo* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizaron dos réplicas biológicas derivadas de experimentos independientes. Los *arrays* se lavaron, secaron por centrifugación y finalmente se escanearon en el escáner *Agilent G2565BA* al 100% PMT y 5 μm de resolución. Los análisis para la expresión diferencial se llevaron a cabo utilizando los software, *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) (Tusher et al., 2001) y el *Multiple Array Viewer 4.2*, incluyendo la corrección para test múltiple utilizando el método del *False Discovery Rate (FDR)*. Los datos crudos y normalizados de estos experimentos son accesibles en la base de datos GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (*Accesion number: GS320528*).

RESULTADOS

Capítulo I: Análisis del efecto de la mielina sobre cultivos de Neuronas Granulares de Postnatales del Cerebelo (CGNs).

Activación de quinasas en cultivos de Neuronas Granulares del Cerebelo (CGNs).

Uno de los modelos neuronales más utilizados en el campo de la regeneración, es el de las Neuronas Granulares del Cerebelo (CGNs). Las CGNs componen la población homogénea más grande de neuronas del cerebro adulto de mamíferos; en el cerebelo representan más del 90% del total. Es por ello que se han establecido como una excelente fuente para la obtención de cultivos primarios neuronales *in vitro*.

Como hemos explicado en la introducción nos hemos centrado en el estudio de la actividad de dos de las quinasas que podrían estar implicadas en la modificación del citoesqueleto neuronal y por tanto estarlo también en el proceso de regulación de la regeneración, como son la ERK1/2 y la GSK3 β .

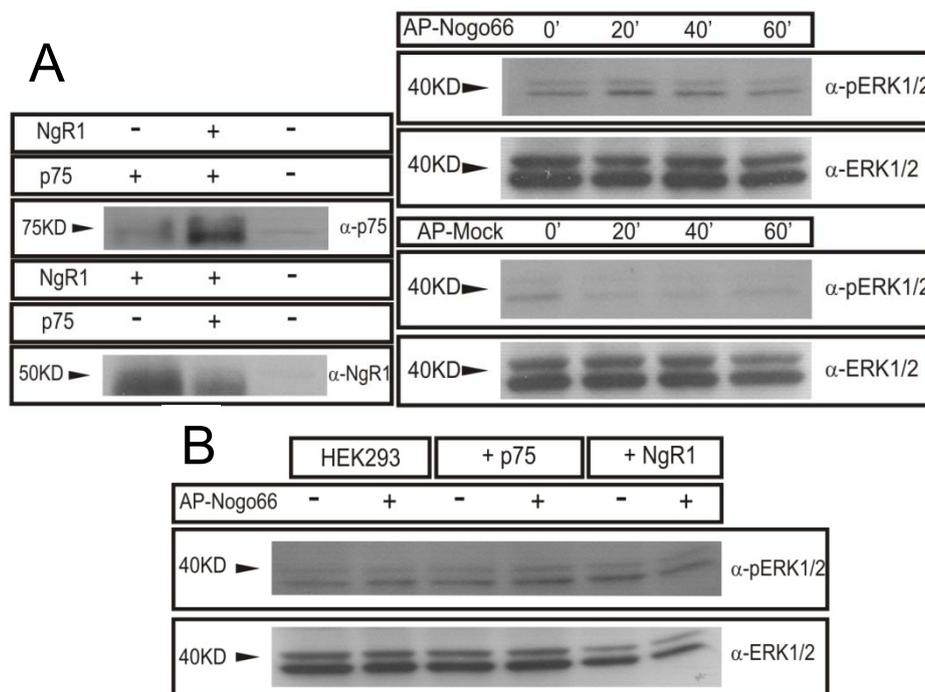


Figura 1. Activación de ERK1/2 en HEK293 transfectadas y en neuronas del hipocampo por AP-Nogo66. A) Las células HEK293 fueron transfectadas con p75- y/o NgR1. Las fracciones proteicas fueron analizadas por inmunoblot (izquierda). A la derecha, *time course* de activación de ERK1/2 en HEK293 co-transfectadas (P75 + NgR1) tras la incubación con AP-Nogo66- o AP-Mock. El pico de activación de ERK1/2 fue apareció tras 20 minutos de incubación, al contrario que en el caso de las células transfectadas estimuladas con AP-Mock. B) Demostración de que la fosforilación de ERK1/2 tiene lugar únicamente tras la transfección simultanea de los ADNsc de p75 y NgR1.

El primer paso a seguir fue la validación de la activación de la vía de ERK1/2 a través de NgR1 tras la estimulación con la proteína inhibitoria recombinante, AP-Nogo66, ya que previamente ya había sido descrita la participación de ERK1/2 en la cascada de señalización inducida por las MAIs a través del NgR1 (Koprivica et al., 2005). Para ello, incubamos células HEK293 deprivadas de suero de manera aguda con el medio condicional que contenía AP-Nogo66, que contiene el *loop* conocido como *Nogo-66*, dominio altamente inhibitorio incluido dentro de la proteína Nogo-A. Lo que pudimos comprobar fue que realmente ERK1/2 tenía un pico de activación pasados 20 minutos después de la estimulación, y que esta activación disminuía progresivamente (Figura 1A). Este efecto no fue observado en respuesta a la incubación con el control, AP-Mock (vector vacío) (Figura 1A). La activación de ERK1/2 era, por lo tanto, dependiente de NgR1 ya que las células transfectadas con el co-receptor p75 o con NgR1 de manera independiente no mostraban activación tras el estímulo con AP-Nogo66 (Figura 1B). Las observaciones confirmaban que nuestro medio condicional que contenía el AP-Nogo66 podía ser utilizado en nuestros experimentos posteriores.

Para llevar a cabo los siguientes experimentos, obtuvimos neuronas granulares

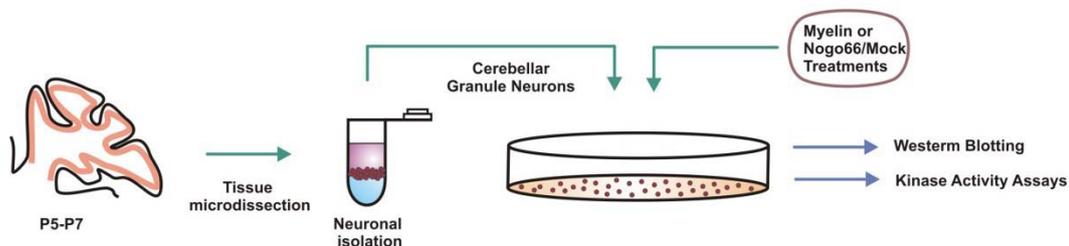


Figura 2. Representación esquemática del procedimiento experimental. Obtención de CGNs a partir de ratones P5-P7. Las CGNs se cultivaron sobre Poli-D Lisina para realizar los ensayos de actividad y análisis por *Western Blotting* tras tratamientos con Mielina o medios condicionados Nogo66/Mock.

del cerebelo y neuronas del hipocampo que fueron cultivadas *in vitro*. Inicialmente los cultivos fueron tratados de manera aguda (Figura 2, ver también Material y Métodos) bien con el medio condicionado AP-Nogo66 o bien con su control negativo, AP-Mock. Al contrario que los cultivos tratados con el AP-Mock, las CGNs y las neuronas del hipocampo incubadas con el AP-Nogo66 mostraron un incremento de la actividad ERK1/2, y también de AKT en el caso de las CGNs (Figura 3). Asimismo, la activación de ERK1/2 se observó

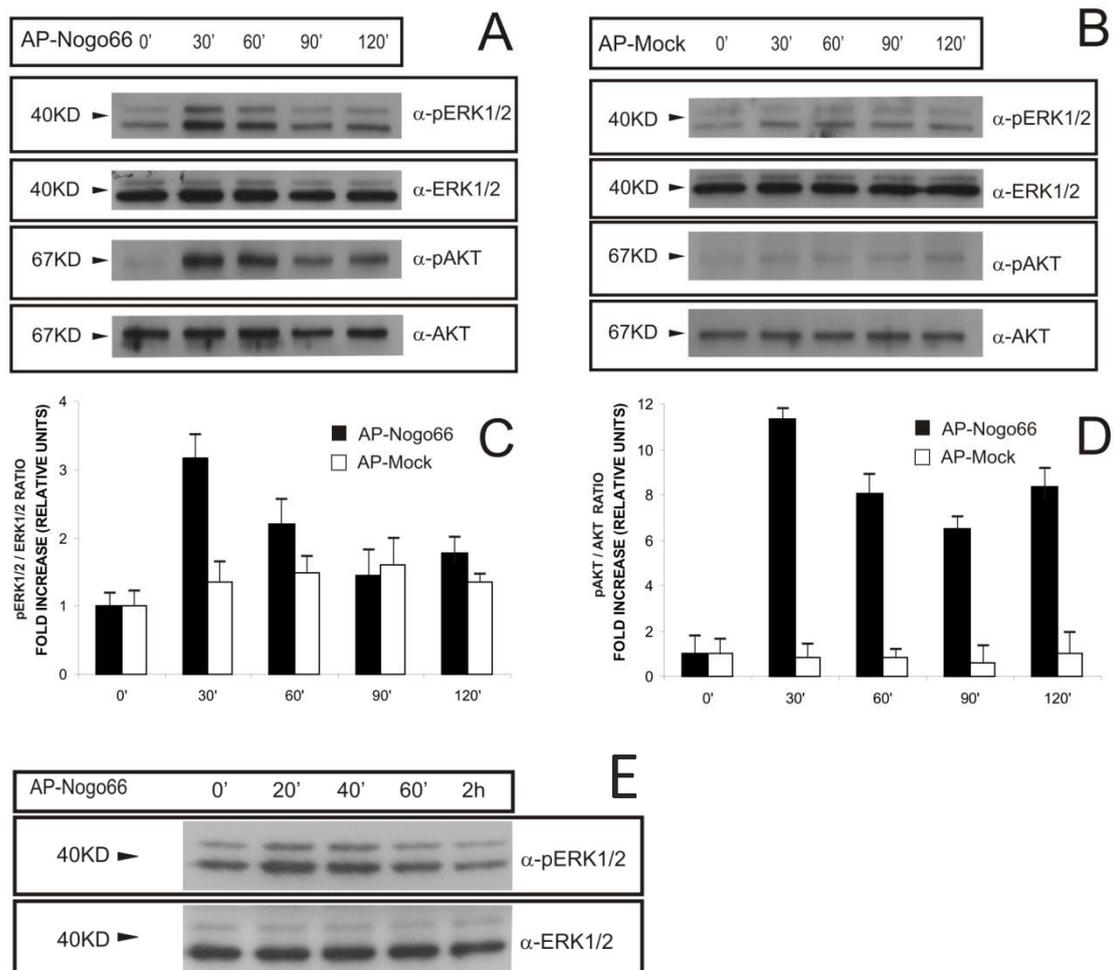


Figura 3. Activación de ERK1/2 y AKT. A,B) Patrón temporal de activación de ERK1/2 Y AKT en Neuronas Granulares del Cerebelo en cultivo, tras la incubación con medio condicionado que contiene AP-Nogo66 o AP-Mock. La cuantificación de la fosforilación de ambas quinasas se muestra en los histogramas (C, D) de la parte inferior. Los valores representan la media \pm DE de tres experimentos por separado. E) *Time course* de la activación de ERK1/2 en neuronas de hipocampo cultivadas durante una semana y tras su incubación con AP-Nogo66. Nótese la similitud con el *time course* para las CGNs.

también en las CGNs después de la incubación con mielina purificada de rata, juntamente con un incremento en la fosforilación de la quinaasa p38 MAPK y una disminución de la fosforilación de la Cofilina, factor despolimerizador de actina, de alrededor del 40% (Figura 4 y Figura 5). Tras la realización de un ensayo por radioactividad de la actividad quinaasa de ERK1/2, se confirma que la actividad de la quinaasa ERK1/2 se ve incrementada 2.5 veces pasados 30 minutos de tratamiento con extracto de mielina (Figura 5A), decreciendo a valores que todavía mantienen un estado de actividad 2 veces superior al estado basal (tiempo 0 minutos) tras 1h de incubación. Al mismo tiempo, pudimos observar cómo existía una respuesta directamente proporcional y dependiente de la concentración de mielina en los niveles de activación de

ERK1/2(Figura5B).

Contrariamente a lo ocurrido con la actividad de ERK1/2, la actividad de la quinasa GSK3 β , medida a través del ensayo de radioactividad, mostró una disminución de alrededor de un 40% después de la estimulación durante 30 minutos con mielina. Aunque rápidamente se produjo un incremento de la actividad hasta alcanzar un pico a los 90 minutos, es a partir de ese punto cuando se produce una disminución de su actividad que se ve reflejada perfectamente en el histograma (120 minutos de estimulación) (Figura 6A). Estos datos fueron corroborados también por *Western blot* mediante el uso de anticuerpos contra los epítomos Serina 9 y Tirosina 216 de GSK3 β (Figura 6B).

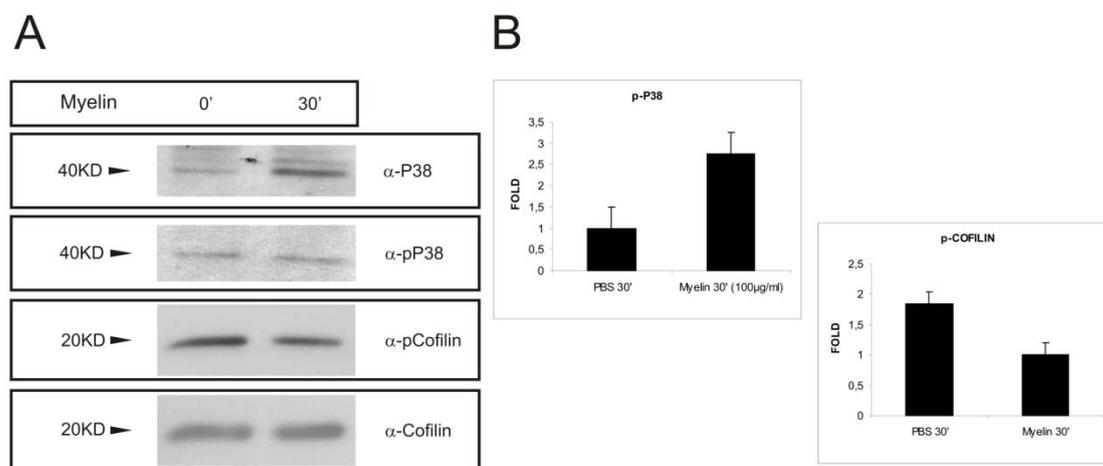


Figura 4. Fosforilación de p38 y Cofilina tras el tratamiento con mielina. A) Inmunoblot que muestra la activación de p38 y fosforilación de Cofilina en CGNs tras el estímulo con mielina durante 30 minutos. B) Histogramas mostrando la cuantificación del grado de fosforilación de p38 y Cofilina.

Con el fin de demostrar que realmente los efectos en el incremento de actividad de GSK3 β podían estar correlacionados con afectaciones en el citoesqueleto neuronal en el axón, decidimos determinar el grado de fosforilación de dos de las principales proteínas diana de GSK3 β y que están ligadas al citoesqueleto microtubular, como son la proteína Tau y MAP1B. Para ello, se realizaron de nuevo tratamientos con mielina sobre cultivos de CGNs (Figura 7). Como podemos observar en los histogramas y en los análisis por *Western blot* (Figura 6 y 7) existe una correlación entre la actividad quinasa y el grado de fosforilación de las proteínas Tau y MAP1B; dónde destaca la fosforilación y actividad quinasa una vez transcurridos 90 minutos tras el tratamiento con mielina.

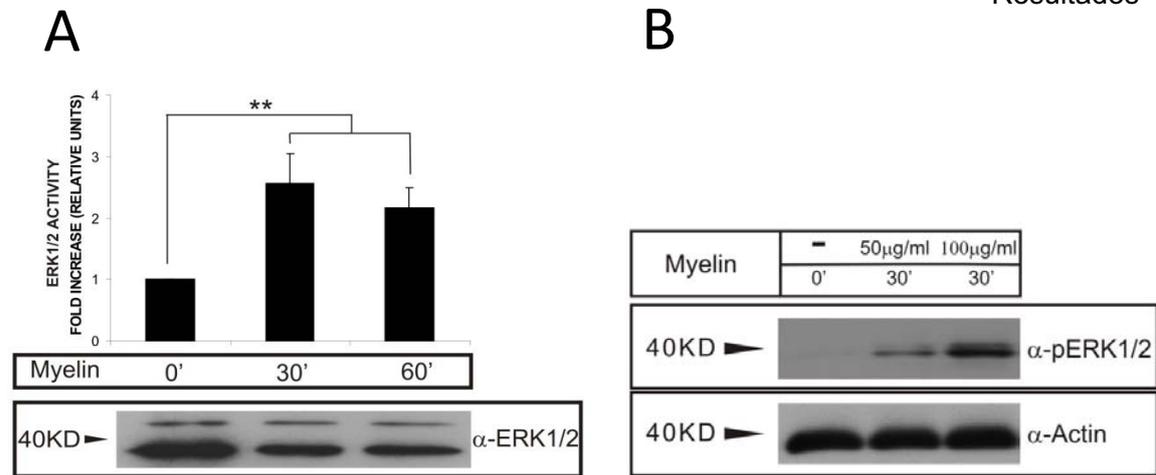


Figura 5. Activación de ERK1/2 tras el tratamiento con mielina. A) Detección de la actividad ERK1/2 en cultivos de CGNs estimulados con mielina y analizados a través de ensayo de radioactividad (ver Material y Métodos para más detalles). Los niveles totales de ERK1/2 en las muestras autorradiográficas se muestran en el inmunoblot. $**p < 0.05$ por test de *t-Student*. B) Inmunoblot que muestra la activación de ERK1/2 en CGNs en cultivo creciendo sobre Poli-D Lisina y tratados con PBS 0.1M, 50 µg/ml o 100 µg/ml de mielina durante 30 minutos. Los niveles de actina se presentan como controles de carga.

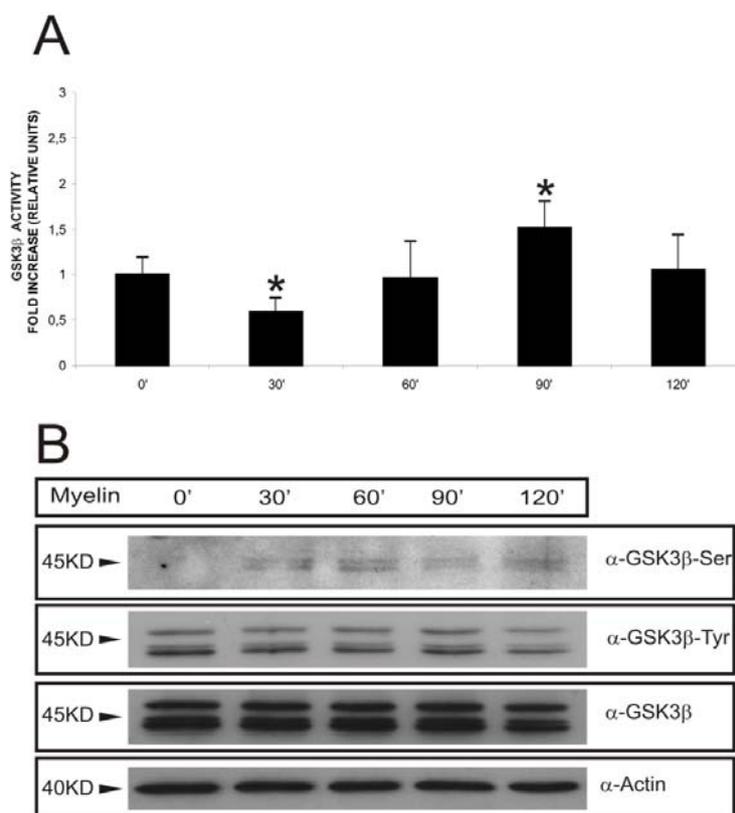


Figura 6. Activación de GSK3β. A) Histogramas mostrando la actividad GSK3β obtenida mediante la utilización de los ensayos de radioactividad y después del tratamiento con mielina. B) Patrón temporal de fosforilación de los dos principales epítomos involucrados en el balance de activación de la quinasa GSK3β (GSK3β-Serina 9 y GSK3β-Tirosina 216) después del tratamiento con mielina. Los valores representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. $*p < 0.05$ a través del test *t-Student*.

A pesar de ello, es bien conocido que la fosforilación de Tau es también regulada a través de la actividad fosfatasa (ej. PP2A) (Yoon et al., 2007). Con el fin de determinar el posible efecto de la actividad fosfatasa en nuestros experimentos de fosforilación, realizamos un ensayo de inhibición con Ácido Okadaico (OA) (100nM) sobre los cultivos de CGNs estimuladas de forma aguda con mielina (Figura 8). Los resultados indican que, primero, los niveles basales de Tau fosforilada incrementan levemente en presencia de OA (tiempo 0 minutos, control basal); y segundo, que pasados 30 minutos de estimulación

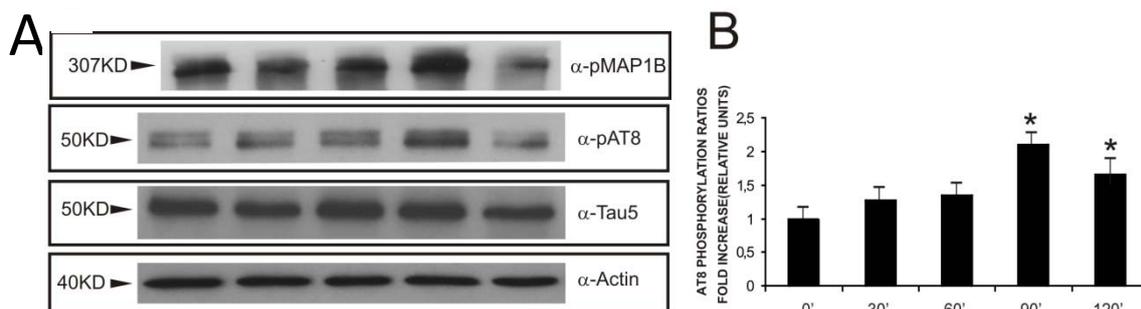


Figura 7. Efecto de la actividad GSK3 β sobre las proteínas asociadas a los microtúbulos. A) Patrón temporal de los niveles de fosforilación de las proteínas MAP1B y Tau (α -AT8) en CGNs después de tratamiento agudo con extractos de mielina. Los niveles de Actina y de Tau total (α -Tau5) se muestran como controles de carga. B) Cuantificación de los experimentos de fosforilación de Tau en forma de histograma. Valores representando la media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ a través del test de la *t-Student*.

con mielina tiene lugar un marcado incremento en la fosforilación de los epítomos reconocidos por el anticuerpo AT8 en los cultivos de neuronas tratados con OA en comparación con los no tratados que mantienen el pico de fosforilación a los 90 minutos tras la estimulación (ver Figura 7).

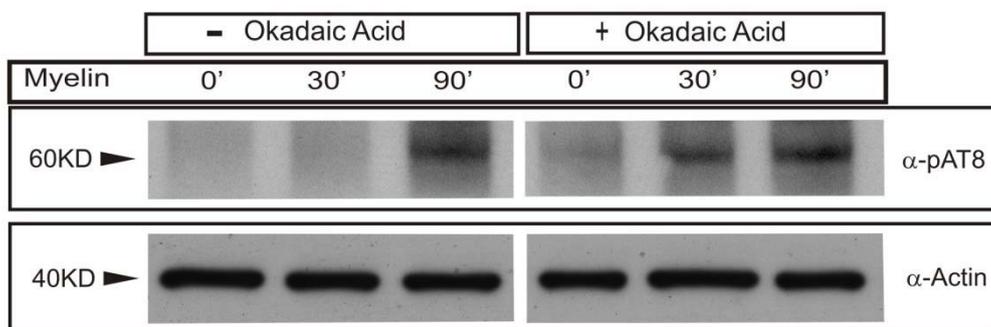


Figura 8. Efecto de la actividad fosfatasa. Inmunoblots contra el epítipo AT8 de la proteína Tau obtenidos a partir de cultivos de CGNs tratadas con Ácido Okadaico y estimuladas con mielina a diferentes tiempos. Los niveles de actina se muestran como controles de carga.

Activación diferencial de ERK1/2 y GSK3 β en cultivos de CGNs después de tratamiento agudo o crónico con mielina.

Tras comprobar que efectivamente nuestra mielina producía la activación de nuestras quinasas de interés después del tratamiento agudo; y de que sus dianas microtubulares Tau y MAP1B eran fosforiladas tras el incremento de actividad, realizamos nuevos experimentos. Como pudimos ver en algunos trabajos anteriores, siempre ha existido cierta controversia entre los resultados de inhibición por mielina, o derivados, obtenidos a través de diferentes estrategias experimentales o diferentes tipos neuronales; y sobre el posible papel principal del NgR1 en entramado proceso inhibitorio (Giger et al., 2008). De hecho, en un trabajo reciente se ha descrito el papel dual de NgR1; según los autores NgR1 sería únicamente requerido para mediar el proceso de colapso del cono de crecimiento tras estimulación aguda mientras que por otro lado no para la inhibición crónica del crecimiento debida a los inhibidores de la mielina (Chivatakarn et al., 2007)

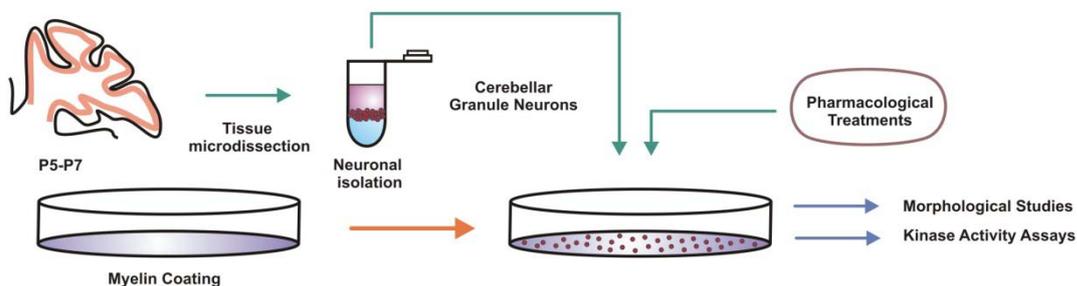


Figura 8. Obtención de CGNs a partir de ratones P5-P7. Las CGNs se cultivaron sobre Poli-D Lisina o Poli-D Lisina + Mielina para realizar los ensayos de actividad, y los estudios morfológicos, así como los tratamientos farmacológicos.

A partir de estos indicios nos planteamos la realización de una serie de experimentos en consonancia. Para comenzar, realizamos nuevos análisis de la activación de ERK1/2 y GSK3 β en CGNs tras el tratamiento agudo o crónico con mielina y paralelamente también realizamos análisis de su crecimiento sobre sustratos recubiertos con mielina (crónico) durante un periodo de 24 horas (Figura 8). Como vemos, los niveles de fosforilación de ERK1/2 y de GSK3 β en su epítipo Serina 9 (que indica baja actividad de la quinasa) incrementan pasados 30 minutos tras el tratamiento agudo con mielina (Figura 9A). Sin embargo, cuando las CGNs se cultivan sobre sustratos recubiertos de

extractos de mielina durante 24 horas no se observa ninguna activación relevante por parte de la ERK1/2 en los *Western blot* (Figura 9A). Al contrario, podemos apreciar una disminución importante en el caso de los niveles de fosforilación de la Serina 9 de la GSK3 β , lo que nos estaría indicando una activación notable de GSK3 β en CGNs creciendo sobre extractos de mielina durante 24 horas. Esta activación fue además corroborada a través de un ensayo de radioactividad de la actividad quinasa GSK3 β en las mismas condiciones de crecimiento de CGNs sobre sustrato de mielina (Figura 9B). Estos resultados sugieren que, mientras que en el caso de GSK3 β sí sería posible el uso de inhibidores para promover e incrementar la regeneración de los axones de las neuronas granulares del cerebelo que crecen sobre mielina, esta posibilidad no parece ser viable para el caso de la quinasa ERK1/2.

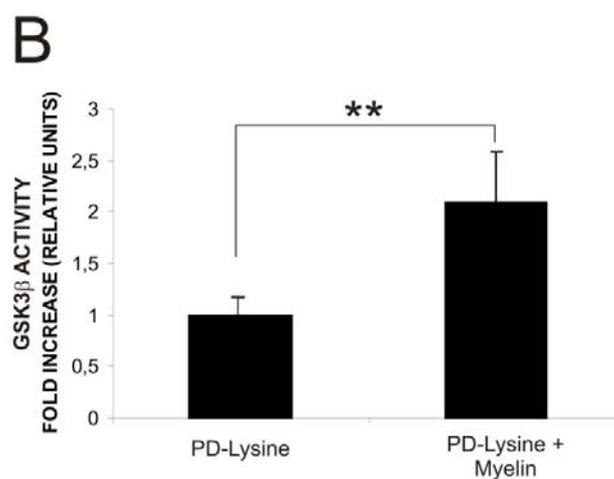
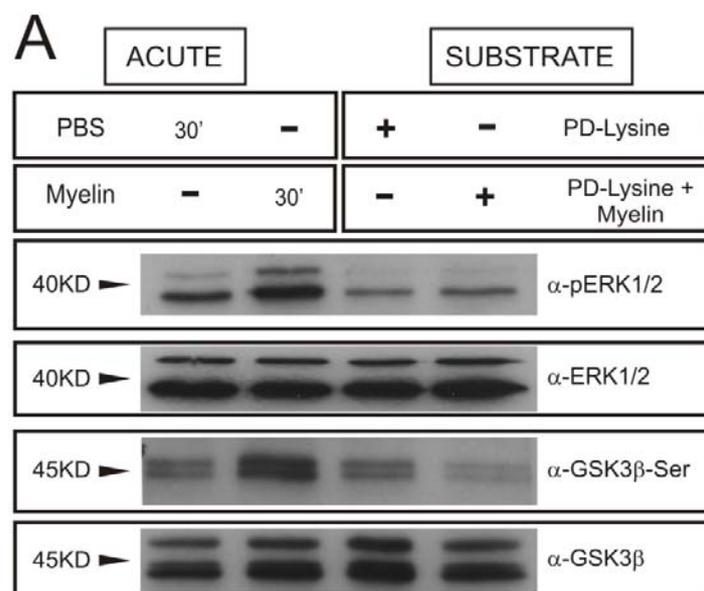
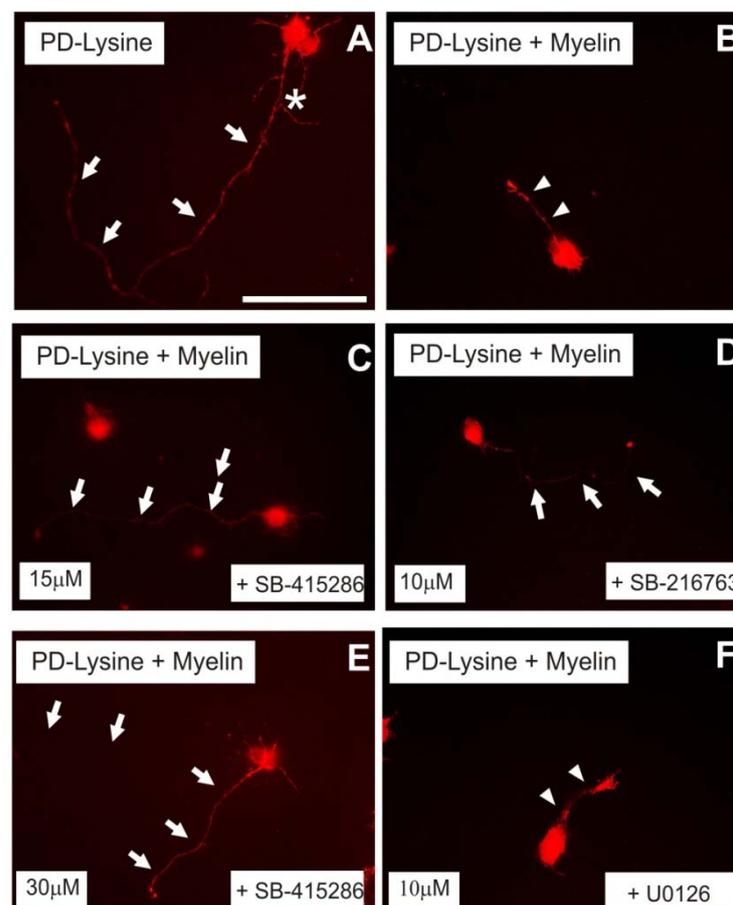


Figura 9. Activación diferencial de ERK1/2 y GSK3 β en CGNs tras tratamientos agudo o crónico con mielina. A) Inmunoblots mostrando la activación de ERK1/2 y GSK3 β en cultivos de CGNs creciendo sobre Poli-D Lisina y tratados con PBS 0.1 M o mielina (agudo, izquierda) o, de manera alternativa creciendo sobre Poli-D Lisina o Poli-D Lisina + Mielina (substrato, derecha). Como observamos, el tratamiento agudo con mielina activa ERK1/2 e incrementa los niveles de fosforilación del epítipo Serina 9 de la GSK3 β . Los cultivos en cambio, no muestran activación de ERK1/2 pasadas 24h en presencia de un sustrato de mielina. Por el contrario, los niveles de fosforilación de en Serina 9 se reducen en las mismas condiciones experimentales, indicando una activación global en el caso de la GSK3 β . ERK1/2 y GSK3 β totales representan los controles de carga. B) Histograma representando los valores de actividad, mediante ensayo de radioactividad, de la GSK β en CGNs cultivadas en condiciones crónicas (sobre sustrato). Los valores representan la media \pm DE de 4 experimentos independientes. ** $p < 0.05$ a través del test de *t-Student*.

Así pues cuando las CGNs son cultivadas sobre mielina observamos una disminución de la longitud neurítica de aproximadamente un 47.3% (Figura 10A-B). La inactivación de la GSK3 β con el inhibidor SB-415286 (15 y 30 μ M) promueve un incremento de la longitud neurítica de un 21.3% y un 21.6% respectivamente (Figura 10C, E,G). Para confirmar que realmente la inhibición de GSK3 β promovía la regeneración se utilizó otro inhibidor específico para la quinasa, el SB-216763 (3 y 10 μ M) que al igual que el SB-415286 dio lugar a un incremento en la longitud neurítica de 18.9% y 23.8% respectivamente (Figura 10D,H).



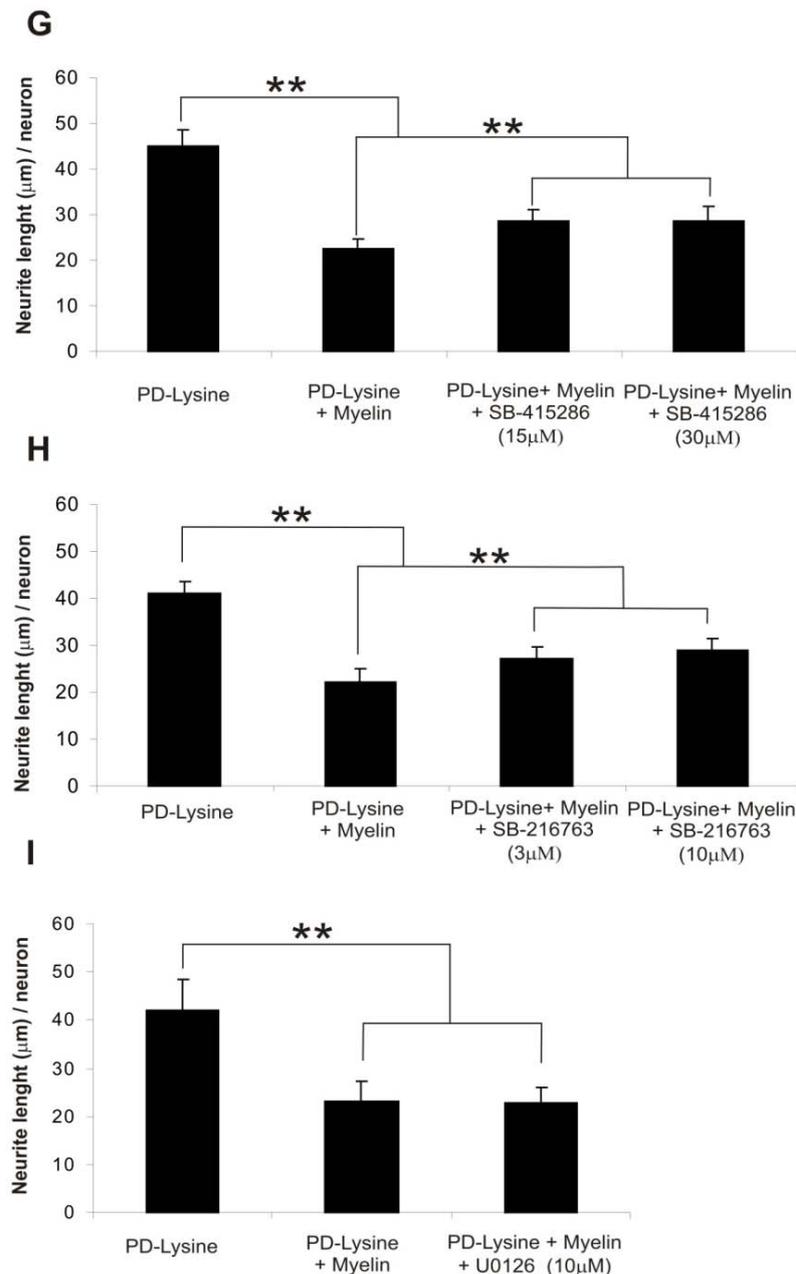


Figura 10. Efectos de la mielina y los inhibidores de ERK1/2 y GSK3 β sobre la longitud neurítica de la CGNs *wild type*. A-F) Microfotografías que ilustran diversos ejemplos de CGNs *NgR*^{+/+} cultivadas sobre Poli-D Lisina o Poli-D Lisina + Mielina (8 µg por superficie de cultivo, 35 mm \varnothing). Las neuronas que crecen sobre la superficie de Poli-D Lisina extienden largas neuritas (flechas) rápidamente después de ser cultivadas *in vitro* (48 horas) y a menudo presentan diversas ramificaciones (asteriscos) (A, G-I). De manera opuesta, cuando las CGNs son cultivadas sobre Poli-D Lisina + Mielina se produce un importante reducción en la extensión neurítica (B, G-I) (punta de flecha). Las CGNs cultivadas sobre Poli-D Lisina + Mielina recuperan de forma parcial su longitud neurítica original después del tratamiento con los inhibidores SB-415286 (15 y 30 µM) y el SB-216763 (10 µM) inhibidores específicos de la GSK3 β (flechas) (C, E, G, H), contrariamente a lo que ocurre con el tratamiento con el inhibidor U0126 (10 µM) de la ERK1/2 (puntas de flecha) (F,I). La cuantificación de los experimentos está representada en forma de histogramas (G-I), donde los valores representan la media \pm DE de la longitud neurítica de 40 neuronas para SB-415286 (30 µM), 42 neuronas en SB-415286 (15 µM), 40 neuronas para SB-216763 (3 µM), 50 neuronas para SB-216763 (10 µM) y 30 neuronas para los tratamientos con el U0126 (10 µM). ** $p < 0.05$ con el test *t-Student*.

De manera contraria a los efectos del boqueo de GSK3 β , el bloqueo de la quinasa ERK1/2, como era de esperar por los resultados de actividad obtenidos en cultivos de CGNs sobre mielina, no indujo un recrecimiento neurítico significativo sobre sustrato de mielina (Figura 10F,I).

La inhibición de GSK3 β incrementa el crecimiento neurítico en las CGN de manera independiente a la expresión de NgR1.

Tras conocer los efectos positivos de los inhibidores sobre la extensión neurítica de las CGNs cultivadas sobre la mielina. Nos preguntamos si dichos efectos sobre la extensión neurítica podían ser dependientes de la expresión del NgR1. Para continuar con dichos experimentos nos decantamos esta vez por el uso del inhibidor SB-415286 ya que, como veremos más adelante brindó efectos mucho más eficientes respecto al SB-216763 en el modelo de lesión en organotípicos entorrino-hipocámpicos.

Para ello, se prepararon de nuevo cultivos de CGNs pero en esta ocasión obtenidos a partir de ratones deficientes para el NgR1 (*NgR1*^{-/-}) (Zheng et al., 2005). Previamente se verificó el genotipo de la colonia (Figura 11) mediante el genotipaje por PCR de alguno de los miembros progenitores (Figura 11A). Además, también se confirmó la carencia de expresión de la proteína

NgR1 a través del análisis por *Western blot* de homogenados de cerebro de animales adultos de la colonia; los cuales fueron comparados con animales *wild type* (Figura 11B). Como podemos apreciar se confirma que los animales

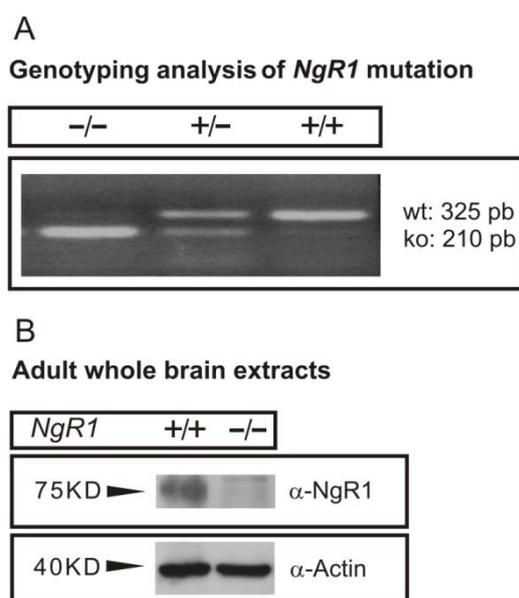


Figura 11. Ausencia de NgR1 en animales *NgR1*^{-/-}. Con el fin de confirmar la no expresión de NgR1 en los ratones mutantes realizamos genotipajes (A) en ratones *wild type*, heterocigotos i KO. Además de comprobar la expresión de la proteína por *Western blot* a partir de extractos de cerebro adulto de ratón.

utilizados para estos experimentos eran deficientes tanto para el gen como para la expresión de la proteína (Figura 11).

Una vez demostrada la carencia del gen y su expresión, se realizaron experimentos similares a los realizados para los animales salvajes (Figura 12). Las neuronas granulares fueron de nuevo cultivadas sobre sustratos control (Poli-D lisina) o bien sobre el sustrato con mielina (inhibitorio) durante 24 horas

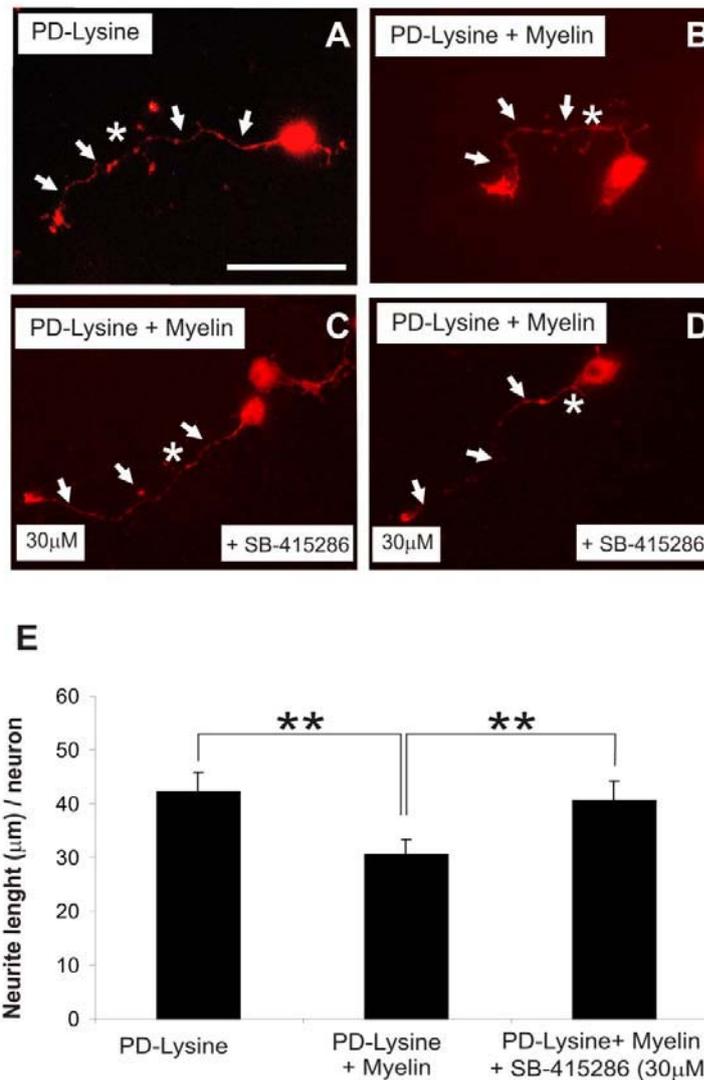


Figura 12. Efectos de la mielina y los inhibidores de ERK1/2 y GSK3β sobre la longitud neurítica de la CGNs en ratones *knock out*. A-D) Microfotografías que ilustran algunos ejemplos de CGNs de animales *NgR1^{-/-}* marcadas con faloidina y cultivadas sobre Poli-D Lisina o Poli-D Lisina + Mielina (como en la Figura 10) (A,B) y tratadas con inhibidores de la GSK3β (C,D). Apreciar que las CGNs que crecen sobre Poli-D Lisina + Mielina extienden sus neuritas (flechas) y a menudo presentan ramificaciones (asteriscos) con en el caso de las CGNs *NgR1^{-/-}* cultivadas sobre Poli-D Lisina. Las CGNs cultivadas sobre Poli-D Lisina + Mielina muestra mayores niveles de recuperación de la longitud neurítica después de tratamiento con el inhibidor SB-415286 (C-E), en comparación con las CGNs *NgR1^{+/+}* (ver Figura 10). La cuantificación de los experimentos se muestra en el histograma (E) de la parte inferior, donde los valores representan a la media ± DE de la longitud neurítica de 90 neuronas para cada grupo experimental en 4 experimentos independientes. ** $p < 0.05$ con el test *t-Student*.

(mismo periodo de tiempo que había sido utilizado en los anteriores ensayos de crecimiento neurítico).

Como podemos ver representado en las microfotografías y cuantificado en los histogramas de la Figura 12, podemos destacar en primer lugar la escasa diferencia en la extensión de la neuritas de las CGNs provenientes de ratones *knockout* respecto a las que provenían de animales *wild type* en condición de crecimiento sobre PDL (sustrato control) ($45.2 \pm 4 \mu\text{m}$ vs. $42.3 \pm 3.5 \mu\text{m}$) (Figura 10G-I, 12E). Cabe destacar que además, las CGNs *NgR1* *-/-* que crecen sobre la mielina muestran una reducción del valor de longitud neurítica respecto a las neuronas *NgR1* *-/-* que crecen sobre Poli-D lisina (27.7%; $30.8 \pm 2.95 \mu\text{m}$ vs. $42.27 \pm 3.53 \mu\text{m}$, respectivamente) (Figura 12A,B,E); pero por otro lado con respecto a las neuronas *wild type*, éstas presentan una mayor extensión (35%) cuando son cultivadas sobre sustratos que contienen mielina ($30.48 \pm 2.95 \mu\text{m}$ vs. $22.5 \pm 3.3 \mu\text{m}$, respectivamente) (comparar con la segunda barra de los histogramas de la Figura 10, sustrato con PDL más extracto con mielina) (Figuras 10; 12). Así mismo, cuando tratamos con $30 \mu\text{M}$ del inhibidor SB-415286, el crecimiento neurítico en las neuronas *NgR* *-/-* alcanza valores de longitud neurítica similares a los observados en estas neuronas cuando están creciendo sobre sustrato control con Poli-D Lisina ($40.57 \pm 3.47 \mu\text{m}$ vs. $42.27 \pm 3.7 \mu\text{m}$, respectivamente) (Figura 12A, C-E).

Capítulo II: Análisis del efecto de la axotomía de la vía Entorrino-Hipocámpica (EHP) en cultivos organotípicos.

Análisis del perfil genético de expresión después de axotomía de la vía Entorrino-Hipocámpica (EHP) *in vitro*.

Con el fin de evaluar los genes cuya transcripción fue regulada 1, 3 y 7 días después de axotomía de la vía EHP (ver Material y Métodos para más detalles), las muestras de RNA fueron analizadas con *Agilent whole genome mouse lohng oligonucleotide (44base) probe based microarrays*. Fueron regulados un total de 699 genes tras la lesión, con un máximo de 407 genes regulados a los 3 días después de la axotomía, y un análisis de agrupamiento mostró que los genes eran reunidos en cinco patrones de expresión (Figura 1).

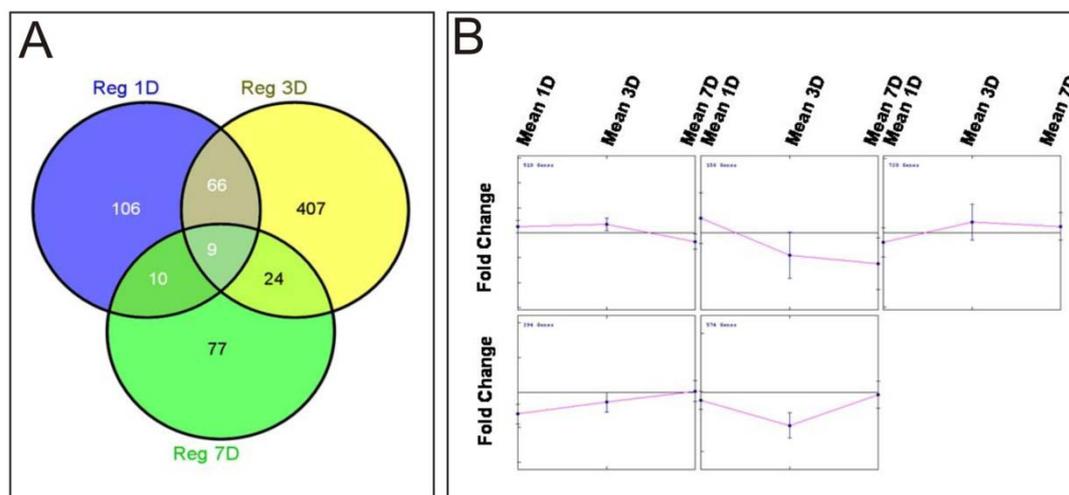


Figura 1. Análisis de la regulación de la expresión génica tras axotomía de la EHP. A) Diagramas de Ven mostrando el número e genes regulados solapados a diferentes tiempos tras axotomía. Varios genes fueron regulados más de una vez y 9 de ellos fueron regulados en todos los tiempos post axotomía: *Cds1*, *Edg2*, *Egr1*, *Hspa5*, *Insig1*, *Mcam*, *Ns5atp9*, *Plp*, *Spp1* (lista completa disponible en la base de datos GEO, ver Material y Métodos) B) Análisis de agrupación mediante MeV (Multiple Epression Viewer) de los genes regulados tras axotomía de EHP, mostrando los diferentes patrones de expresión de los genes durante los tiempos experimentales.

En primer lugar, nos interesamos en testar si la axotomía de la vía EH inducía la activación de vías de muerte celular o bien apoptosis, para descartar así la posible influencia de las mismas sobre las vías implicadas en la señalización desencadenada por las MAIs a través del NgR1. Sin embargo, no se encontraron cambios relevantes en la expresión de los marcadores apoptóticos

o de muerte celular en las rodajas axotomizadas de la EHP (Figura 2). Como era de esperar, algunos de los genes de los cuales ya se conocía que eran sobreexpresados tras un daño físico en neuronas como *Clu* (Wehrli et al., 2001), *FGF2* (Yoshimura et al., 2001) y el *IGF2* (Gluckman et al., 1998) eran claramente sobreexpresados transcurridos 3 días. Asimismo, también comprobamos si los inhibidores asociados a la mielina (MAIs) estaban de igual forma sobreexpresados después de la axotomía de la EHP. En efecto, la mayoría de las proteínas incluidas en los *arrays* (ej. *MAG*, *MBP*, *MOG*, *MOBP* y *Plp*) fueron altamente sobreexpresadas a los 3 y 7 días tras axotomía de EHP. Contrariamente, la expresión del gene *Rtn4* (Nogo-A) permaneció constante después de la axotomía.

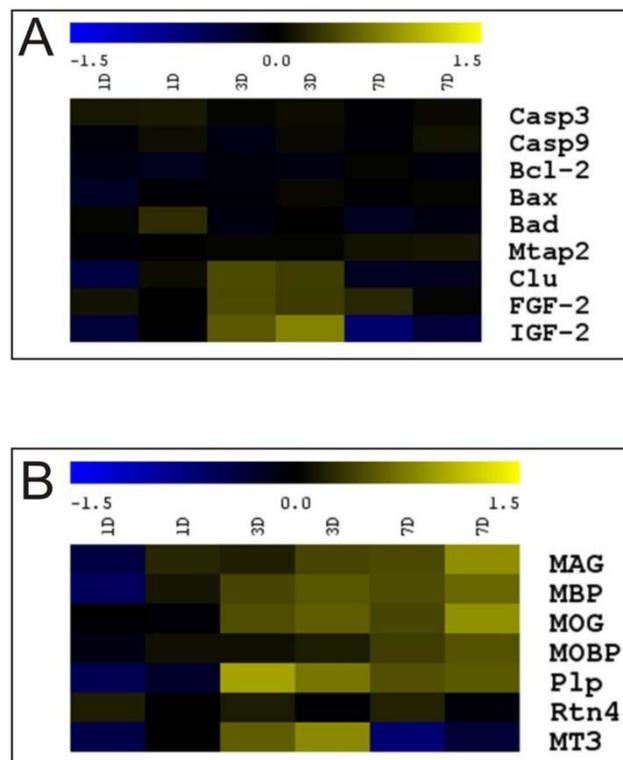


Figura 2. Análisis de la expresión génica de genes de apoptosis o daño neuronal y de genes asociados a la mielina tras la axotomía de la EHP en cultivos organotípicos *wild type*. Análisis de la expresión génica de marcadores apoptóticos y marcadores de daño neuronal (A) y de proteínas inhibitorias asociadas a mielina (B) tras 1, 3 y 7 días tras axotomía de EHP mediante el uso de *arrays* *Agilent* de genoma completo de ratón. El color en cada celda de la tabla representa el nivel de expresión del gene, en azul mostrando la infraexpresión y en amarillo la sobreexpresión. Abreviaturas: Casp3-9, Caspasa 3 y 9; Bcl-2, *B-cell lymphoma protein 2*; Bax, *BCL2-associated X protein*; Bad, *BCL2-associated agonist of cell death*; Mtap2, *Microtubule-associated protein 2*, *Clu*, *Clusterin*; FGF-2, *Fibroblast growth factor 2*; IGF-2, *Insulin growth factor 2*; MAG, *Myelin associated glycoprotein*; MBP, *Myelin basic protein*; MOG, *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*; MOBP, *myelin-associated oligodendrocyte basic protein*; Plp, *proteolipoprotein*; RTN4, *Reticulon 4 (Nogo-A)*; MT3, *metallothionein 3*.

Patrón de expresión de las MAIs, CSPGs y la actividad quinasas en rodajas de co-cultivos organotípicos EH

Para corroborar los datos obtenidos mediante los estudios de *microarrays*, pasamos a determinar, utilizando la técnica de *Western blot*, los niveles de expresión de las proteínas asociadas a mielina, Nogo-A (*Rtn4*), OMgp y MBP tras 30 y 90 minutos y; 3 y 12 días tras la axotomía de la EHP en rodajas obtenidas a partir de ratones *wild type* (Figura 3A). Como podemos ver en los paneles de la Figura 3, los niveles de expresión de la proteína OMgp y MBP incrementan en los co-cultivos de EH lesionados, y de manera más notable a los 3 y 12 días después de lesión (DAL, del inglés, *Days After Lesion*) (Figura 3A). Por otro lado, los niveles del condroitín sulfatos, determinados con el marcador CS-56, fueron mantenidos y relevantes a lo largo del tiempo en los co-cultivos axotomizados, de manera especial a los 10 DAL (Figura 3B) (ver también, (Mingorance et al., 2006).

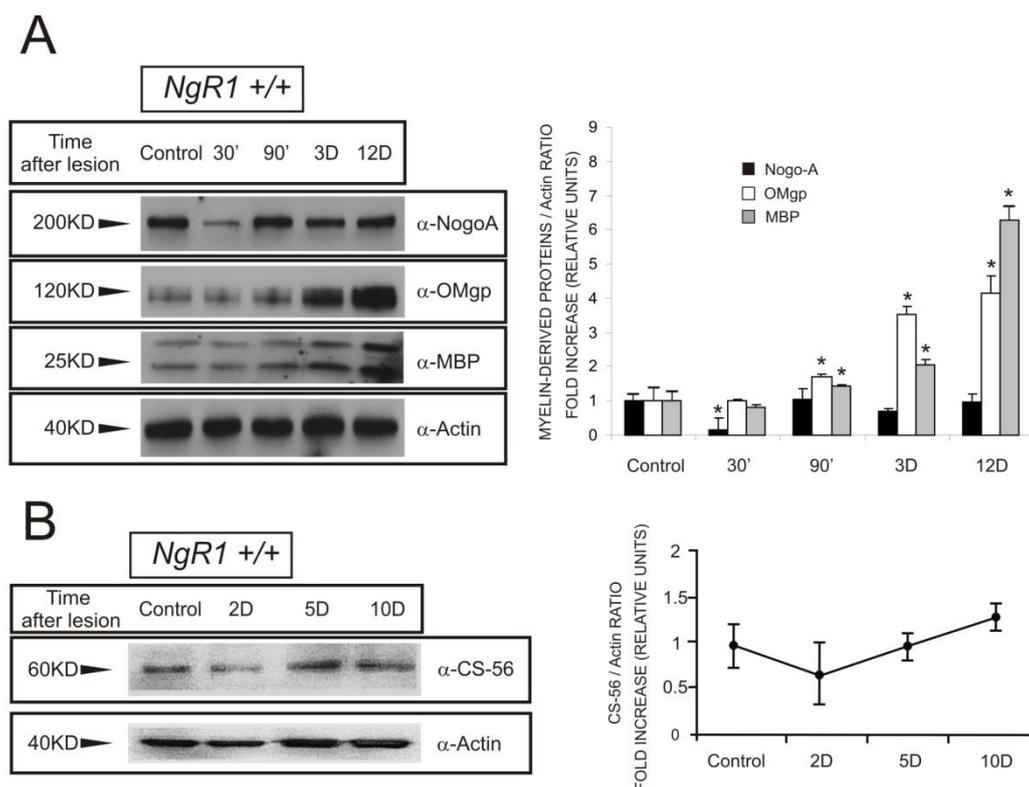


Figura 3. Presencia de MAIs y CSPGs tras axotomía de la EHP. Patrón de expresión de las MAIs (A) y los CSPGs (B) en co-cultivos organotípicos entorrino-hipocámpicos mediante western blot (izquierda). Podemos observar un incremento relevante de expresión de OMgp y MBP tras lesión. Por el contrario, Nogo-A permanece constante. Y los CSPGs incrementan de forma moderada varios días tras la lesión. A la derecha se encuentran cuantificaciones de los *Western*. Los valores representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$ con el test *t-Student*.

Los siguiente que analizamos fue el grado de actividad de las quinasas en los co-cultivos EH axotomizados, tanto de animales *NgR1+/+* como *NgR1-/-* (Figuras 4A,B). Como podemos apreciar, la actividad de la quinasa ERK1/2 muestra un incremento inicial a los 30 y 90 minutos después de la axotomía pero posteriormente decrece de manera pronunciada a los 3 y 12 DAL en ambos modelos de animales, *NgR1+/+* y *NgR1-/-*.

Además, el análisis inmunohistoquímico de co-cultivos lesionados obtenidos a partir animales *wild type*, presenta un incremento relevante de la ERK1/2 en su forma fosforilada en la región próxima al lugar de lesión, marcaje que contrasta con el nulo marcaje observado en las neuronas Entorrino-Hipocámpicos en proyección de co-cultivos control y lesionados, en los que no se observa ningún tipo de cambio en el marcaje (Figura 5A,B). Este incremento en la fosforilación

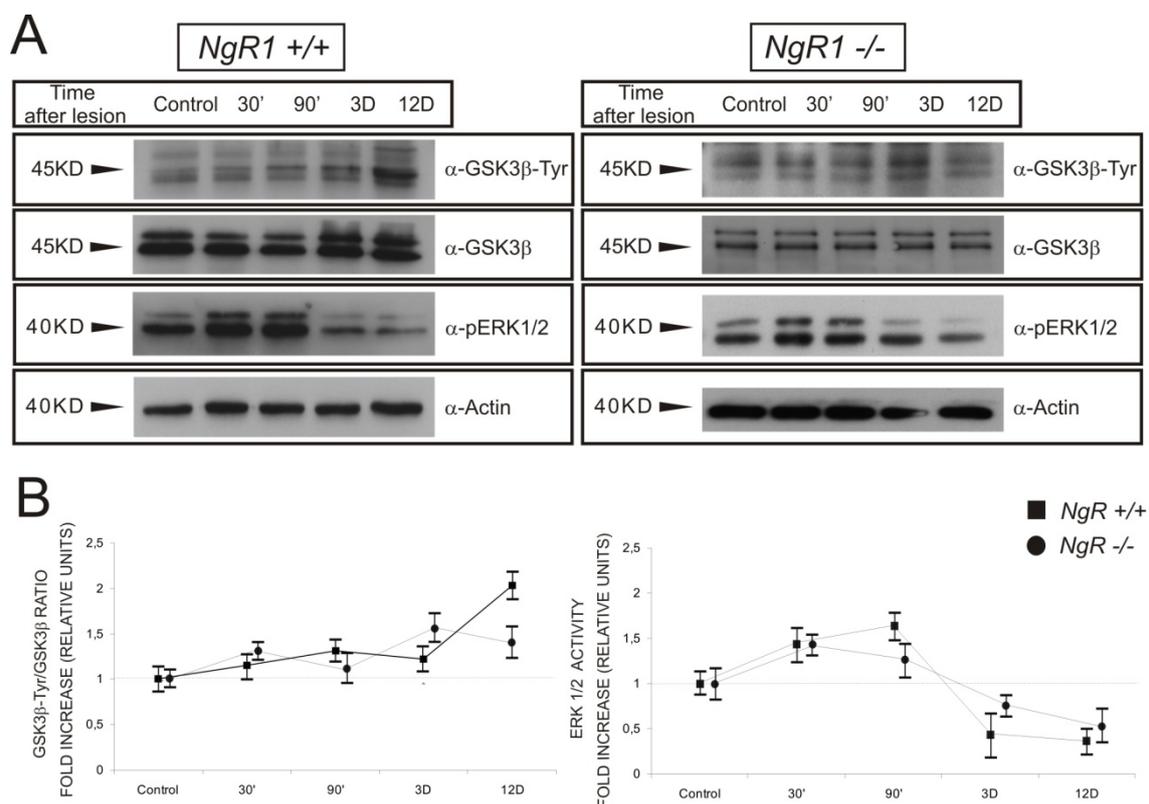


Figura 4. Actividad quinasa tras axotomía de la EHP. A) Análisis por *Western blot* de la actividad quinasa de GSK3b y ERK1/2 en cultivos de EH axotomizados de animales *NgR1+/+* y *NgR1-/-*. Como podemos apreciar ERK1/2 decrece transcurridos 3 y 12 DAL en ambos casos. Por el contrario, la actividad GSK3β incrementa en esas etapas en comparación con las condiciones basales. B) Representación gráfica del grado de actividad del *time course* de activación tras lesión. Los valores representan la media \pm SEM DE 4 (*NgR1+/+*) y 3 (*NgR1-/-*) experimentos independientes.

de ERK1/2 está prácticamente ausente en los co-cultivos EH pasados 2 días después de la lesión (Figura 5C). Estos resultados sugieren que en las rodajas de co-cultivo EH axotomizados, la activación de ERK1/2 está asociada principalmente con las reactividad celular en el lugar de la lesión y no estaría afectando a las neuronas en proyección que han sufrido axotomía. Sin embargo, no podemos descartar una posible participación de la expresión génica mediada por la quinasa ERK1/2 neuronal que no hemos determinado en nuestros análisis histológicos y que podría estar regulando factores neuronales que podrían estar involucrados en las respuestas regenerativas de los axones dañados o bien estar implicados en la supervivencia neuronal.

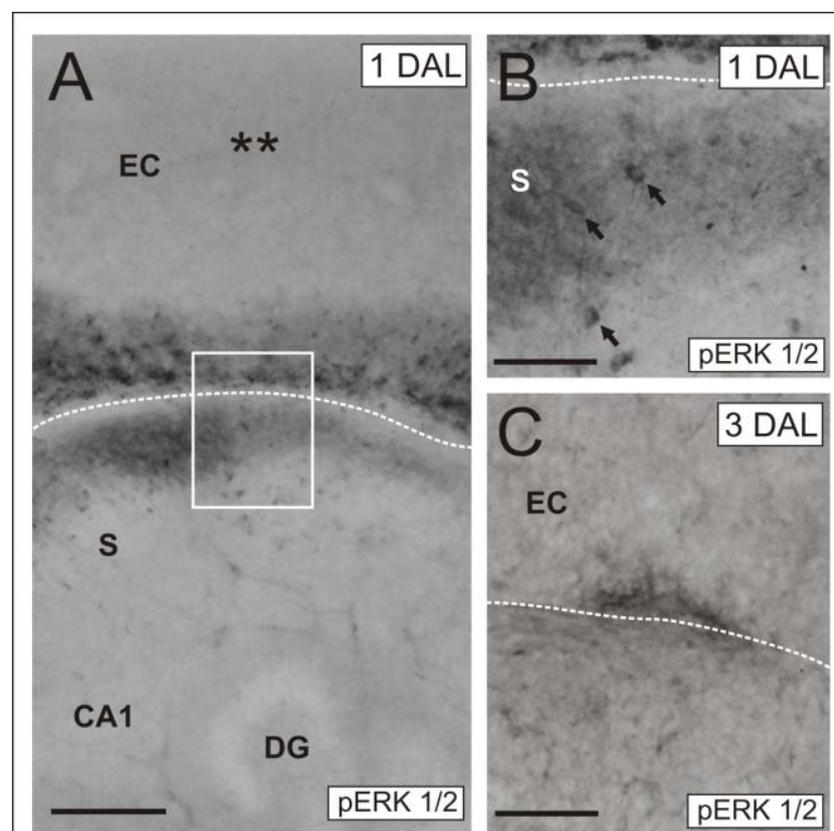


Figura 5. Activación de ERK1/2 tras axotomía de la vía EH en cultivos organotípicos. A) Microfotografía ilustrando el patrón de expresión de ERK1/2 fosforilada 1 DAL en co-cultivos EH. Apréciase que el mayor nivel de inmunoreactividad se encuentra cercano a la zona de lesión. B) Microfotografía de aumentada de la región marcada por la caja blanca mostrada en A). Nótese la presencia de células inmunoreactivas (flechas). C) Microfotografía ilustrando la disminución de la fosforilación de ERK1/2 tras 3 DAL en co-cultivos de eh lesionados. Abreviaciones CA1-3, hippocampal fields; DG, *dentate gyrus*; EC, *entorhinal cortex*; EHP, *Entorhinal-hippocampal pathway*; S, *subiculum*. Escala: A= 200 μ m y B-C= 100 μ m.

Por otro lado, se realizaron experimentos de *Western blot* paralelos con los que se demuestra que la actividad GSK3 β incrementa de forma constante después de la lesión de la EHP en rodajas *wild type* (*NgR1+/+*), especialmente a los 3 y 12 DAL (Figura 4).

Además también se determinó que, aunque de manera menos relevante que en el caso de las rodajas *wild type*, la activación de GSK3 β también tiene lugar en los co-cultivos organotípicos lesionados obtenidos de animales *NgR1-/-* a los mismos días después de la lesión (Figura 4). Desafortunadamente los anticuerpos contra GSK3 β de los que disponemos en laboratorio no reconocen los residuos fosforilados de GSK3 β en secciones histológicas de cultivos organotípicos Entorrino-Hipocámpicos.

La activación de GSK3 β en rodajas de animales *NgR1-/-* sugiere que otras moléculas inhibitoras (ej. CSPGs (Mingorance et al., 2006) (resultados presentados en esta tesis), o Semaforinas secretables (Montolio et al., 2009) también presentes en las rodajas de organotípicos lesionadas y que podrían sobre la actividad GSK3 β durante las etapas tardías en ambos tipos de cultivos, los *wild type* y en una menor medida en los cultivos *knockout* probablemente debido a la ausencia del receptor NgR1. A pesar de ello, los datos presentados señalan la quinasa GSK3 β como una posible diana para la promoción de la regeneración axonal tras la lesión de la vía Entorrino-Hipocámpica (EHP) *in vitro*.

Reparación de la EHP lesionada a través del bloqueo de la actividad GSK3 β *in vitro* en organotípicos *NgR1+/+* y *NgR1-/-*

Con el fin de confirmar la posible participación clave de GSK3 β en la inhibición de la regeneración axonal y comprobar el posible potencial de su inhibición en la promoción de dicha regeneración, en primer lugar realizamos una serie de tratamientos en los organotípicos EHP lesionados de ratones *wild type* con los inhibidores SB-415286 y SB-216763; y con la forma permeable en membrana, C3-transferasa (TAT-C3) (Tan et al., 2007) que bloquea la actividad dependiente de RhoA, y con el péptido NEP1-40, como previamente había sido descrito en anteriores trabajos (Mingorance et al., 2006) (Figura 6)

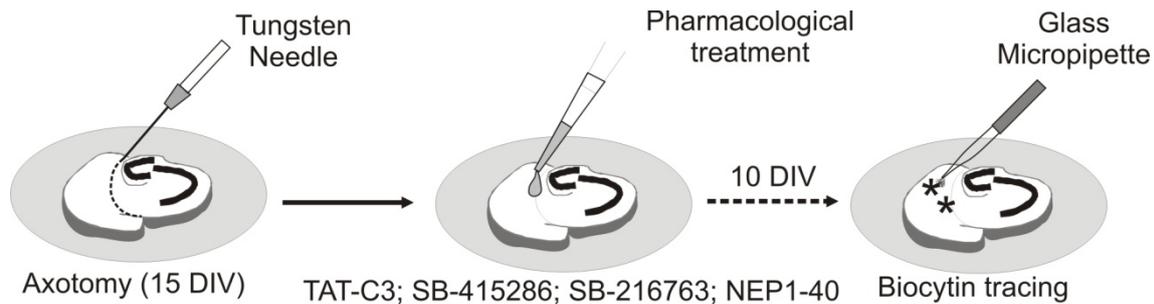


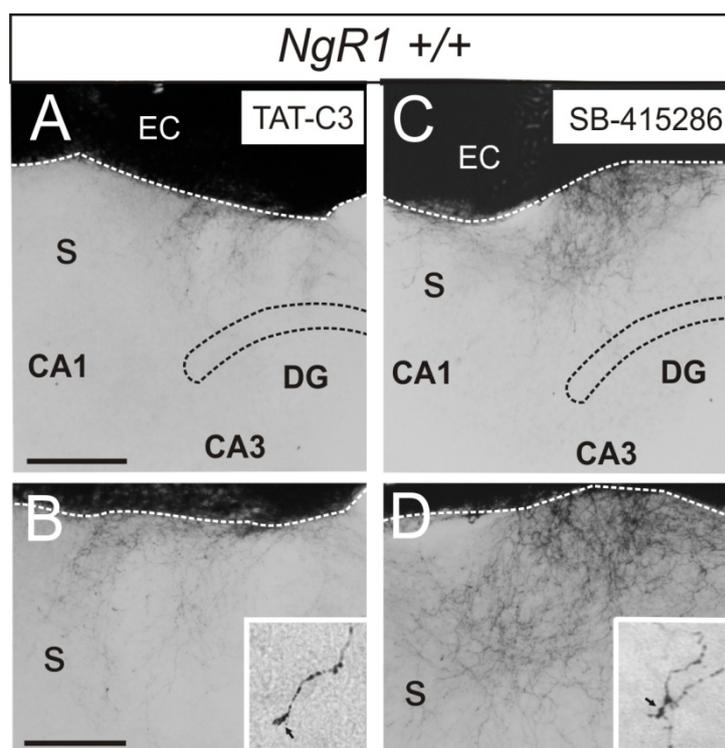
Figura 6. Representación esquemática del procedimiento experimental.

Los consiguientes cultivos demostraron que el tratamiento agudo con el inhibidor SB-415286 (30 μM) sobre los co-cultivos organotípicos axotomizados durante un periodo de 10 días daba lugar a un recrecimiento de numerosos axones entorrinales que penetraban en la región del hipocampo (Figura 7C-E) ($25.3 \pm 6.4 \mu\text{m}$; media \pm DE). De manera similar, co-cultivos organotípicos axotomizados esta vez tratados con el segundo inhibidor de la GSK3 β , el SB-216763 (10 μM) mostraron también recrecimiento de los axones entorrinales (Figura 7F) ($18.5 \pm 4.6 \mu\text{m}$; media \pm DE).

Opuestamente, en los co-cultivos no tratados la gran mayoría de axones EH se detenían en la región próxima a la lesión y muy pocos conseguían atravesar la zona lesionada y entrar en el hipocampo (Figura 7E). Los axones regenerados, que terminaban en conos de crecimiento (Figura 7A-D), no siempre presentaban un crecimiento directo hacia el *stratum lacunosum moleculare/molecular layer* (slm/ml) y a menudo crecían ectópicamente, pero conseguían atravesar la lesión (Figura 7A-D)

Por otro lado, y en comparación con los controles, el tratamiento con NEP1-40 (100 μM) da lugar a un incremento significativo en el número de axones regenerados marcados con biocitina que entran en el hipocampo, un incremento que es similar al observado causado por el SB-415286 y SB-216763 (Figura 7E). Sin embargo, el tratamiento con el TAT-C3 da lugar a una baja regeneración de los axones entorrinales ($14.3 \pm 3.2 \mu\text{m}$) si lo comparamos con los tratamientos con SB-415286, SB-216763 y NEP1-40 (Figura 7A, B, E).

El siguiente paso, fue preparar co-cultivos organotípicos EH a partir de ratones *NgR1*^{-/-} que fueron axotomizados transcurridos 15 DIV. Debido a los resultados previamente obtenidos con los cultivos *wild type*, los co-cultivos *NgR1*^{-/-} fueron tratados con 30 μ M del inhibidor SB-415286, 10 μ M del inhibidor SB-216763 o bien con tampón fosfato a modo de control (Figura 8). Tras el marcaje con biocitina, como podemos observar en los controles, los axones no son capaces de atravesar la zona de lesión y por tanto no llegan a entrar en el hipocampo (Figura 8A, D E), por el contrario, se observa un gran número de axones que sí lo consiguen tras el tratamiento con los inhibidores de la GSK3 β ($4.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ vs. $18.2 \pm 3.1 \mu\text{m}$, control vs. SB-415286; $3.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$ vs. $14.6 \pm 2.7 \mu\text{m}$, control vs. SB-216763) (Figura 8D, E). Los axones regenerados presentan trayectorias aleatorias en la región hipocámpica del cultivo organotípico con ambos inhibidores de GSK3 β (Figura 8B-C). Además, mediante microscopía electrónica, podemos encontrar con frecuencia terminales axonales (TA) de los axones entorrinales que habían conseguido regenerar y que mostraban un marcaje con biocitina (Figura 9). Entonces, el tratamiento con SB-415286 es más eficiente que con el SB-216763 en conseguir mejorar la regeneración axonal tanto en cultivos *NgR1*^{+/+} como en *NgR1*^{-/-}, y refuerza la idea de que la regeneración axonal previa obtenida con ambos tratamientos en cultivos de Células Granulares del Cerebelo, es independiente a la expresión de NgR1.



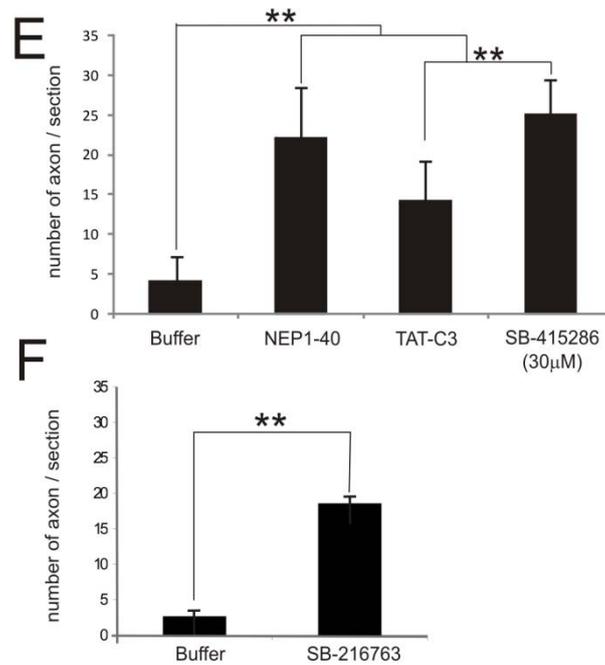
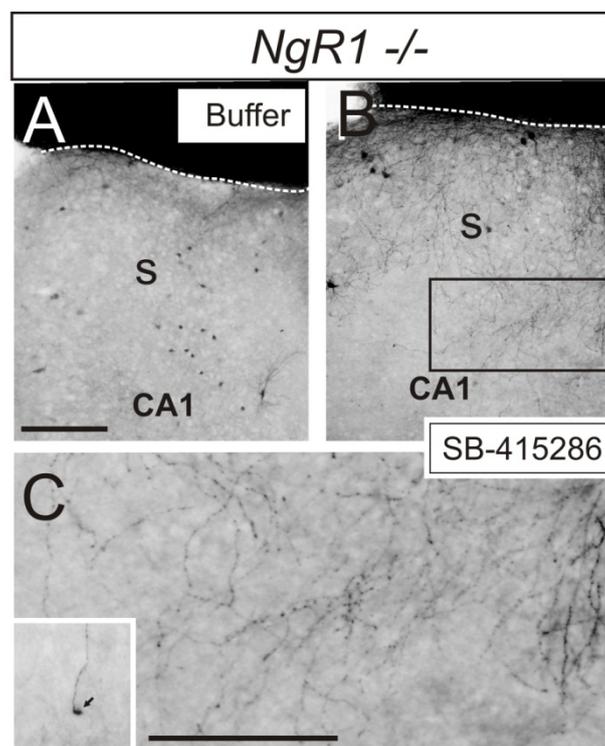


Figura 7. Regeneración de la vía EHP axotomizada tras el tratamiento con SB-415286 y SB-216763 en cultivos *NgR1*+/-. A-D) Patrón de regeneración con el tratamiento TAT-C3 (A-B) y con SB-415286 (C-D). La EHP no muestra un elevado nivel de regeneración tras el tratamiento con TAT-C3 en comparación con el SB-415286. La presencia de fibras que terminan en conos de crecimiento (flechas) en el hipocampo se muestra en las cajas insertadas en B) y D). E-F) Histogramas que muestran la media del número de fibras marcadas con biocitina que atravesaron un segmento de 400 μ m en el hipocampo localizados entre 75-80 μ m paralelamente a la transección y en secciones consecutivas de cada cultivo tras realizarse los diferentes tratamientos. El número de cultivos en cada tratamiento fue el siguiente: Controles n=62 (41 gráfico superior+21 gráfico inferior); NEP1-40, n=30; TAT-C3, n=20; SB-415286, n=23; SB-216763, n=18. ****** p <0.05 *t*-student test. Abreviaturas: CA1-3, hippocampal fields; DG, dentate gyrus; EC, entorhinal cortex; EHP, Entorhinal-hippocampal pathway; S, subiculum. Escala: A y B = 200 μ m; C = 100 μ m.



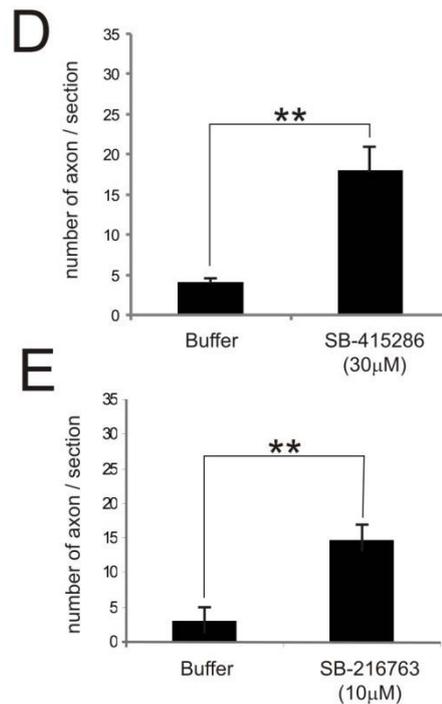


Figura 8. Regeneración de la vía EHP axotomizada tras el tratamiento con SB-415286 y SB-216763 en cultivos *NgR1*^{-/-}. A) Microfotografía que muestra la ausencia de regeneración espontánea en la EHP en cultivos *NgR1*^{-/-}. B,C) Patrón de regeneración con el tratamiento SB-415286. La presencia de fibras terminadas en conos de crecimiento (flechas) se muestran en la caja insertada en C). D, E) Histogramas que muestran la media del número de fibras marcadas con biocitina que atravesaron un segmento de 400 μm en el hipocampo localizado entre 75-80 μm paralelamente a la transección y en secciones consecutivas de cada cultivo tras realizarse los diferentes tratamientos tras el tratamiento con inhibidores de GSK3β. El número de cultivos en cada tratamiento fue el siguiente: Controles n=43 (20 gráfico superior+23 gráfico inferior); SB-415286, n=22, SB-216763, n=16. ***p*<0.05 *t*-student test. Abreviaturas: CA1-3, *hippocampal fields*; DG, *dentate gyrus*; EC, *entorhinal cortex*; EHP, *Entorhinal-hippocampal pathway*; S, *subiculum*. Escala: A y B = 200 μm; C = 50 μm.

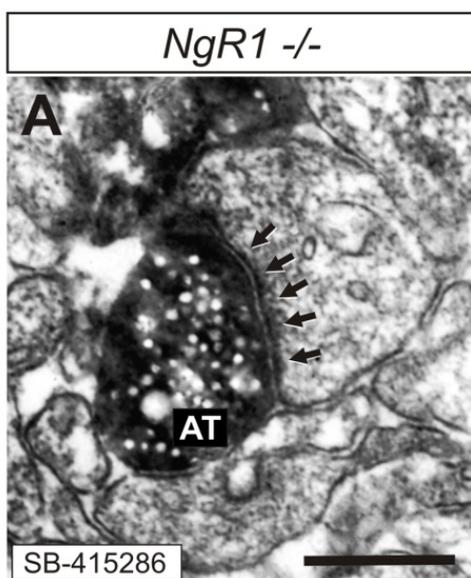


Figura 9. Microfotografía electrónica del terminal (AT) de un axón en regeneración de la EHP en el *stratum lacunosum molecular (slm)*, que establece contacto sináptico (flechas) con una espina dendrítica. El axón (en negro) fue marcado mediante una inyección de biocitina en la región de la corteza entorrinal (EC) de un co-cultivo organotípico *NgR1*^{-/-} tras 10 DIV de tratamiento con el inhibidor de GSK3β, SB-415286. Escala: 0.5 μm.

Capítulo III: Papel de OMgp en plasticidad sináptica

Expresión diferencial de los componentes de las MAIs y del complejo Nogo Receptor 1 durante el desarrollo.

La caracterización de los niveles de expresión se ha llevado a cabo mediante *Western blot* a partir de extractos de la región telencefálica de cerebros de ratones en estadios que van desde el estadio embrionario (E16) al estadio adulto (AD). Si comparamos los niveles de expresión de los ligandos y receptores del complejo NgR1 en el telencéfalo, podemos ver que alguno de los miembros del complejo, así como de las MAIs muestra una expresión temprana en el desarrollo, como es el caso de Nogo-A, OMgp y Lingo-1 (Figura 1).

Esta expresión además de ser anterior al proceso de mielinización, ya que como podemos observar, es anterior a la aparición de la expresión de la proteína básica de la mielina, la MBP (del inglés, *myelin basic protein*) (Figura 1); es también anterior a la expresión del receptor NgR1, por lo que, hipotéticamente, podrían estar desempeñando funciones no asociadas a inhibición mediada por mielina en estas etapas (Figura 1).

Actualmente, algunas de estas proteínas, y también alguno de sus receptores o correceptores, han sido implicados en funciones como son la migración, mielinización, proliferación, diferenciación, crecimiento neurítico y especificación de dianas axonales. Por ejemplo, se ha descrito que durante el desarrollo, Nogo-A está involucrado en diversas funciones como modulación de migración tangencial (Mingorance-Le Meur et al., 2007), crecimiento neurítico (Richard et al., 2005, Mingorance-Le Meur et al., 2007, Montani et al., 2009), direccionamiento axonal (Wang et al., 2008b, c) y diferenciación neural (Wang et al., 2008a). La expresión de OMgp en estadios tan tempranos del desarrollo, anterior a la expresión de NgR1 y al inicio de la mielinización, sugiere que OMgp puede ejercer durante el desarrollo perinatal funciones diferentes a la formación de nodos de Ranvier y a la inhibición del crecimiento axonal tras lesión (Wang et al., 2002b, Huang et al., 2005, Nie et al., 2006).

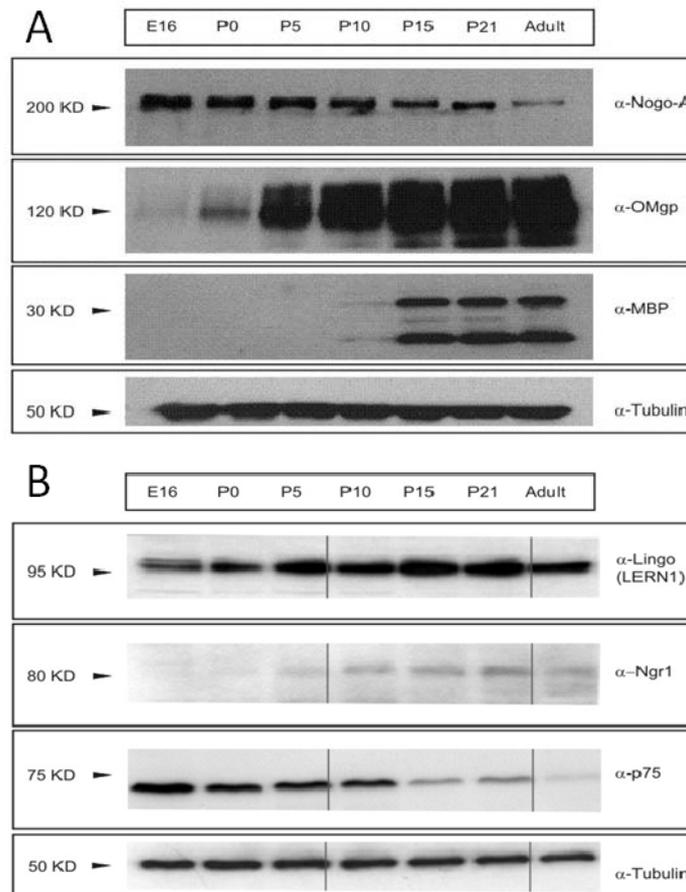


Figura 1. Análisis de los niveles de expresión por *Western blot* de los ligandos, Nogo-A y OMgp, y de los receptores, Lingo-1, Ngr1 y p75^{NTR} durante el desarrollo del cerebro de ratón. La expresión de la proteína MBP nos indica el inicio de la mielinización.

Colocalización de OMgp y marcadores presinápticos en las estructuras *bouton-like in vitro* y en fracciones sinaptosomales *in vivo*.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se había observado la expresión de la proteína OMgp en estructuras tipo neurópilo durante el desarrollo perinatal (ej. delimitando el campo terminal de la proyección tálamo-cortical en la capa IV de la corteza) (Gil et al, 2010) A partir de esos estudios se decidió examinar la posible presencia de OMgp en sinápsis (Figura 2). Para ello se realizaron cultivos primarios de neuronas del hipocampo que fueron mantenidos durante 7 días *in vitro* y sobre los cuales se realizaron estudios inmunocitoquímicos de colocalización (Figura 2 A-F). Vemos como las neuronas del hipocampo MAP2 positivas son marcadas completamente contra la proteína OMgp (Figura 2 A-C) además de estar presente en las varicosidades de tipo axonal. Los estudios de colocalización muestran como

OMgp colocaliza en estas varicosidades con proteínas sinápticas como la Sinapsina (Figura 2 D-F). Con el fin de confirmar que realmente OMgp estaba presente en los terminales presinápticos se analizó la distribución de la Sintaxina-1 y SNAP-25 (marcadores presinápticos) mediante la técnica del

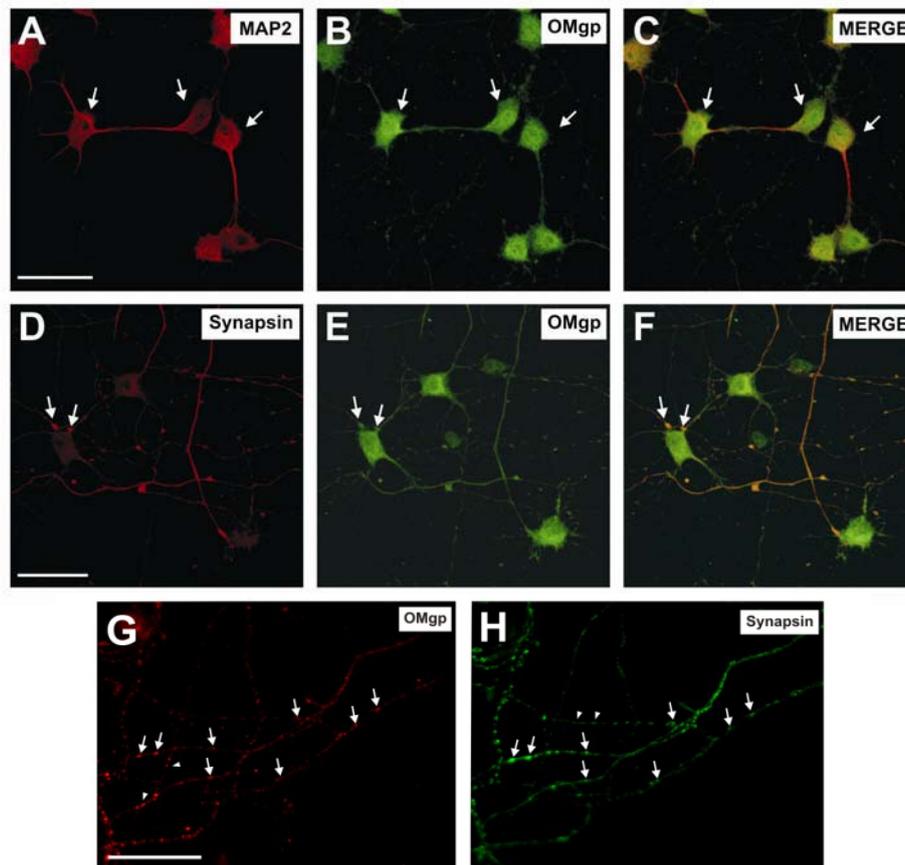


Figura 2. Expresión de OMgp en cultivo de neuronas de hipocampo MAP2 positivas y terminales presinápticos Sinapsina positivas *in vitro*. A-C) Microfotografías de confocal ilustrando cultivos de hipocampo (7DIV) incubados con los anticuerpos α -OMgp y α -MAP2 para demostrar la expresión de OMgp en neuronas MAP2 positivas (flechas). D-F) Cultivos paralelos fueron incubados con anticuerpos α -OMgp y α -Sinapsina para demostrar la presencia de OMgp en los terminales axonales (las flechas señalan los terminales Sinapsina positivos). G,H) Expresión de OMgp en varicosidades axonales Sinapsina positivas en neuronas de hipocampo en cultivo. Apreciar que algunas de las pocas varicosidades OMgp positivas (punta de flecha) son Sinapsina negativas. Barra de escala: (A,D,G) 25 μ m también para (B,E), (C,F) y (H) respectivamente.

subfraccionamiento con glucosa de los sinaptosomas, de cerebros de ratones adultos, y el análisis de su distribución con respecto a OMgp mediante *Western blot*. El fraccionamiento de la preparación sinaptosomal muestra que OMgp está presente en la membrana y en las fracciones vesiculares (F11-17), compartiendo distribución con los marcadores sinápticos pero no en la fracciones citosólica o mitocondrial (F3-9, F19) (Figura 3).

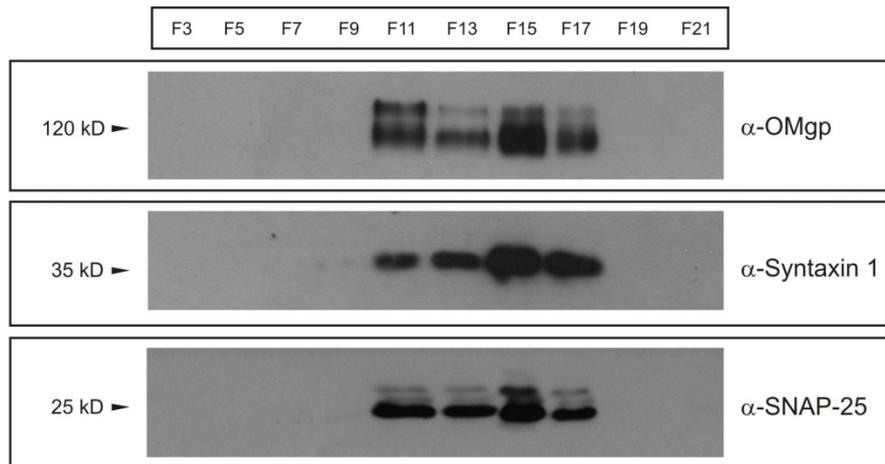


Figura 3. Expresión de OMgp en sinaptosomas fraccionados a partir del prosencéfalo o cerebro anterior de ratones adultos. Apreciar que OMgp es detectada en las mismas fracciones (membrana/vesículas) que son inmunoreactivas para la Sintaxina 1 y SNAP-25.

En conjunto, estos resultados nos sugieren que OMgp estaría localizada en la sinapsis en neuronas en desarrollo y en el cerebro adulto de ratón.

OMgp participa en la modulación de la transmisión sináptica en neuronas en cultivo.

Tras conocer los resultados de los experimentos de co-localización entre OMgp y la Sinapsina en cultivos de neuronas del hipocampo, y después de la confirmación, mediante análisis de las fracciones sinaptosómicas, de su presencia en los terminales presinápticos, decidimos utilizar la nueva tecnología *E²dish*, recientemente descrita, para realizar una serie de experimentos de registro electrofisiológico en neuronas de hipocampo. Para llevar a cabo dichos experimentos, se obtuvieron neuronas del hipocampo (E16) (Figura 5) que fueron cultivadas en los pozos del microdispositivo (Figura 4) (para detalles ver Capítulo III y Material y Métodos). Una vez las neuronas han sido cultivadas, éstas son mantenidas durante 12 DIV, tiempo necesario para que se produzca el suficiente crecimiento axonal que permita a los axones penetrar en el microcanal (Figura 5B-C) que une los dos pozos del dispositivo. La primera comprobación que realizamos fue asegurarnos de que las neuronas del hipocampo presentaban la típica disposición (Figura 5A) que presentan en cultivos *in vitro* en situación normal (en cultivos de alta densidad) y por tanto

que nuestro dispositivo no estaba afectando al comportamiento del cultivo respecto a los cultivos tradicionales. En segundo lugar, teníamos que asegurarnos de que pasados 12 días *in vitro*, nuestros cultivos iban a ser capaces de extender sus prolongaciones a través del microcanal (Figura 5B-C).

Las neuronas que se adhieren a la superficie de la placa empiezan a extender sus procesos neuríticos, formar sinapsis funcionales con otras neuronas y a crear una red neuronal 2D. Pasados de 3 a 7 días, las neuronas empiezan a generar potenciales de acción espontáneos (EPSPs) que suelen llegar sincronizarse en forma de ráfagas, en las que participan un gran número de neuronas. Estos EPSPs pueden ser registrados en condiciones basales como ya se ha visto en diferentes estudios (Wagenaar et al., 2006, Cohen et al., 2008).

En nuestro caso, hemos observado que los valores basales de la actividad sináptica entre los diferentes dispositivos muestran diferencias importantes, probablemente debidas a las pequeñas, pero importantes, diferencias en la densidad así como a diferencias intrínsecas del propio cultivo. A pesar de ello, todos los dispositivos utilizados muestran axones cruzando a través del microcanal.

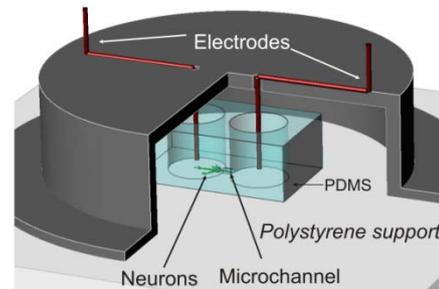


Figura 4. Esquema del dispositivo basado en PDMS. Estructura con dos pozos de 6 mm de diámetro que contienen un microcanal que los interconecta, las estructuras son posteriormente colocadas sobre un sustrato de poliestireno. Se colocan dentro de los dos pozos los dos electrodos de Ag/agCl. Las flechas muestran las diferentes partes del dispositivo y la representación de una neurona.

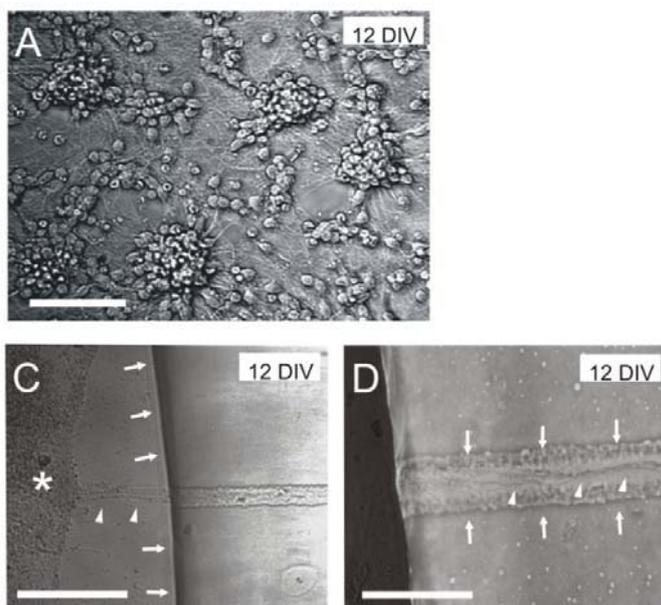


Figura 5. A) Microfotografía de bajo aumento de un cultivo de neuronas de hipocampo (12 DIV). Véase la disposición típica dentro de los pozos. B, C) Fotografía en microscopía de contraste de fase del dispositivo a gran aumento (C) y pequeño aumento (B). Las neuronas en cultivo están marcadas con un asterisco en el panel B. La pared lateral del pozo está marcada con flechas y los axones en expansión a través del microcanal también están marcados con puntas de flecha en el panel B. En C, el microcanal está marcado con flechas y los axones en crecimiento con las puntas de flecha.

En nuestro estudio, realizamos registros de los EPSPs de cultivos en situación control (registro basal), después de estimulación con PBS-BSA y finalmente después de la estimulación con la proteína recombinante OMgp. El control PBS-BSA corresponde al control directo para el tratamiento o estimulación con OMgp recombinante ya que es directamente en este tampón en el que dicha proteína debe ser reconstituida, debido al uso de la proteína BSA para la preparación del tampón primero tuvimos que testar si la estimulación con el tampón PBS-BSA podía dar lugar a modificaciones importantes en el número de potenciales de acción registrados respecto a los registros basales. Una vez registrados y analizados pudimos comprobar que la diferencia entre el número de potenciales de acción rápidos y repetidos (*burst firing*) registrados entre el ≤ 0.05 la situación basal (control sin estimulación) y el control PBS-BSA en dispositivos individuales es menor a un 5% (Figura 6A).

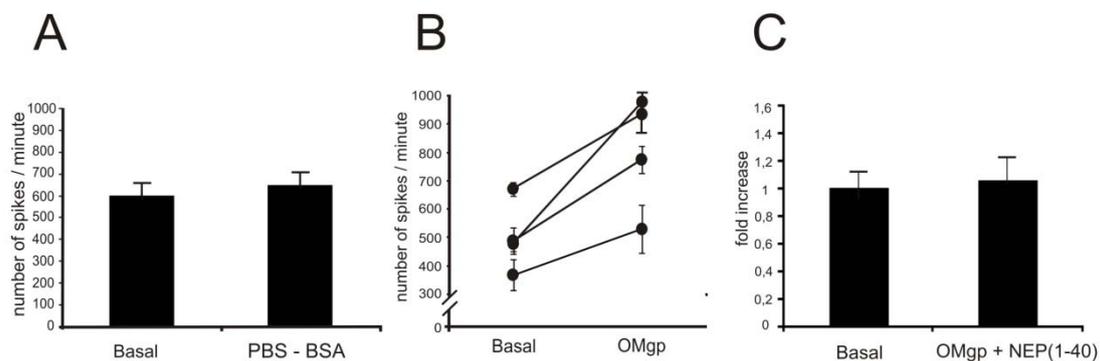


Figura 6. OMgp induce EPSPs en neuronas de hipocampo en cultivo a través de NgR1. A) Histogramas representando los resultados cuantitativos del número de espigas registradas por minuto en condiciones basal o control con tampón PBS-BSA (media \pm DE). B) Trazados de los datos de registro en dispositivos individuales incubados bajo condiciones basales o bien en presencia de OMgp. Los datos son presentados como la media \pm DE del número de espigas por minuto. Observar el relevante incremento de la actividad después del tratamiento con la proteína recombinante. C) Histogramas representando los resultados cuantitativos del número de espigas en situación basal o tras el tratamiento con OMgp y NEP(1-40). Los valores están representados como la media \pm DE. Apreciar que la co-incubación con el péptido NEP(1-40) bloquea el incremento de EPSPs inducidos por OMgp ($p \leq 0.05$, *t-Student test*).

En la Figura 6B está representada la media del número de espigas (spikes)/minuto en condiciones basales y después del tratamiento con OMgp recombinante (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), en dispositivos individuales. Como podemos ver, posteriormente al tratamiento con OMgp recombinante, se registra un

incremento de aproximadamente 125-170% con respecto a las condiciones basales en el número de espigas/minuto.

En la Figura 7 se muestra un ejemplo de un registro típico obtenido en estos experimentos. El gráfico, corresponde a la representación de los valores crudos o sin procesar (voltaje vs tiempo) (Figura 7A) de los patrones de actividad tipo ráfaga (*bursting activity*) registrados en neuronas en cultivo con una ventana temporal de tratamiento de 80 segundos (tratamientos indicados en los paneles superiores al gráfico); además, podemos ver la representación de los datos de este experimento mismo experimento pero en forma de gráfico. Como podemos apreciar, existe un incremento significativo en la frecuencia del número de espigas después del tratamiento con OMgp, incremento que es completamente abolido después del tratamiento con la tetrodotoxina (TTX), toxina que bloquea los canales de sodio impidiendo la transmisión de los potenciales sinápticos (Figura 7B). Este resultado confirma que el tratamiento con OMgp está realmente afectando la actividad sináptica a través de la regulación de los canales iónicos presentes en la membrana.

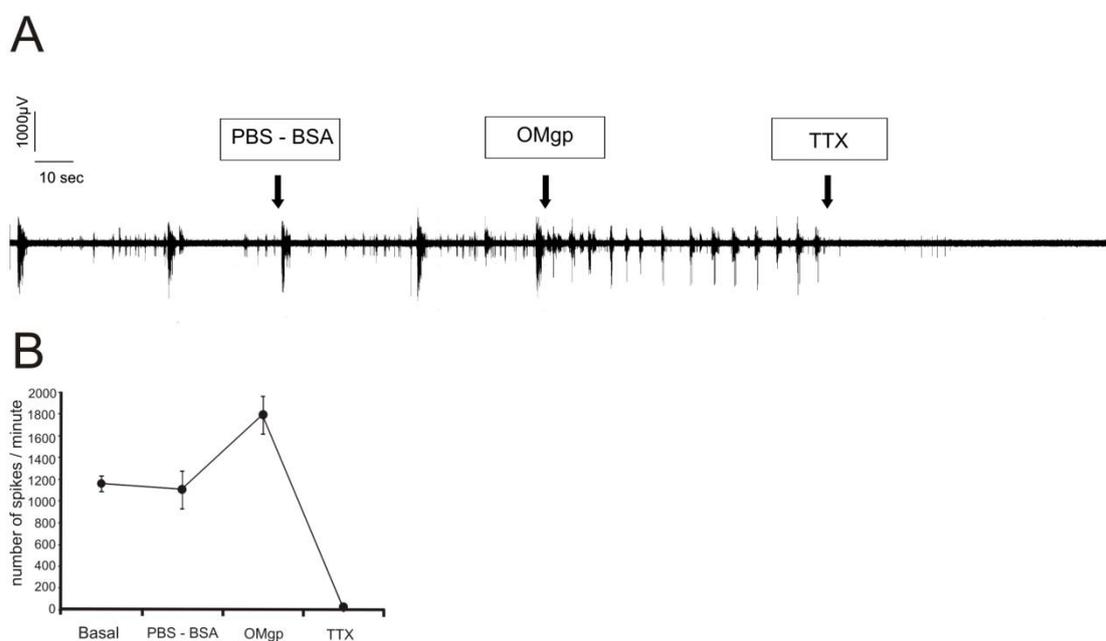


Figura 7. Ejemplo de los datos crudos no procesados (A) y su representación gráfica (B) de un experimento secuencial de registro utilizando el OMgp como estímulo. Apreciar que después del tratamiento con TTX, el incremento en el número de EPSPs inducidos por OMgP desaparece.

Por último, realizamos un nuevo ensayo en el que co-incubamos diferentes cultivos de hipocampo con la proteína OMgp (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y una concentración 30 mM del péptido bloqueante NEP(1-40), que bloquea la señalización dependiente de NgR1 (GrandPre et al., 2002) (Figura 6C). El resultado obtenido con esta combinación de tratamientos es que el incremento en la actividad tipo ráfaga inducida por OMgp se ve bloqueado. Sugiriendo, un posible papel de NgR1 en los efectos producidos por OMgp, sobre la actividad sináptica.

DISCUSIÓN

I. GSK3 β y regeneración axonal

El conocimiento sobre las moléculas inhibitorias presentes en la mielina y el descubrimiento de nuevas proteínas de la familia, o bien de nuevos receptores involucrados en los procesos de inhibición neuronal son actualmente de gran interés para la comunidad científica. Muchos estudios intentan esclarecer los mecanismos intracelulares que conducen a la inhibición del crecimiento neurítico tras una situación de daño o lesión del SNC.

GSK3 β es una de las quinasas básicas involucradas en el crecimiento axonal durante las etapas iniciales del desarrollo, gracias a su función en la modificación de las proteínas asociadas al citoesqueleto neuronal (ej. Tau, MAP1B y CRMPs). Incluso recientemente se ha visto que GSK3 β está involucrada en los procesos inhibitorios que tienen lugar tras la lesión y que inevitablemente impiden el recrecimiento axonal de los axones lesionados (Dill et al., 2008, Alabed et al., 2010, Seira et al., 2010).

Es a partir de ese momento, cuando surge un creciente interés en intentar determinar el papel real de GSK3 β tras ese proceso de lesión. GSK3 β es una quinasa clave sobre la que convergen numerosas y diversas vías de señalización, característica que la convierte en una posible diana terapéutica en la promoción de la regeneración axonal.

a. Activación quinasa diferencial tras el tratamiento con mielina y axotomía in vitro: análisis de los modelos para el estudio de la regeneración

Es bien conocido que el empleo de diferentes modelos (neuronales en este caso) puede conllevar a la obtención de resultados muy diferentes entre sí como discutiremos más adelante en más detalle. Así pues, es completamente razonable analizar los efectos de las MAIs en diferentes modelos.

Neuronas Granulares del Cerebelo (CGNs)

Los resultados obtenidos a partir del modelo de las Neuronas Granulares del Cerebelo, muestran como tras los tratamientos agudos con mielina y AP-Nogo66 se produce una activación de las quinasas ERK1/2 y AKT, que correlaciona con la actividad observada para la GSK3 β en cultivos de CGNs. Además, la activación de GSK3 β también está correlacionada con un incremento de la fosforilación de dos de sus principales dianas asociadas al citoesqueleto microtubular como son Tau (Serina 199/202) y MAP1B. Sin embargo, la activación de ERK1/2 tiene solamente lugar de manera rápida tras la exposición a mielina y AP-Nogo66. Esta activación temprana ha sido confirmada en cultivos de CGNs sobre sustrato de mielina durante un periodo prolongado en el tiempo (estimulación tardía o crónica) en la que no se ha observado un incremento de actividad ERK1/2. Incluso la aplicación de inhibidores específicos para ERK1/2 hemos demostrado que no produce un incremento de la regeneración axonal en CGNs cultivadas sobre sustratos de mielina, al contrario de lo observado con el uso de inhibidores selectivos de GSK3 β en esas mismas condiciones, sugiriendo una ventana de efectividad del bloqueo de ERK1/2 limitada a un periodo de estimulación agudo. Algunos resultados indican que la inhibición inducida por las MAIs a través del NgR1 únicamente tiene lugar en las fases agudas tras lesión (Chivatakarn et al., 2007). Sin embargo, estos resultados difieren con los de otros estudios en los que se demuestra que péptidos inhibidores de NgR1 (ej. NEP1-40 entre otros) son útiles en el tratamiento crónico tras lesión, (Li and Strittmatter, 2003, Mingorance et al., 2006) y dejando abierta la posibilidad de preguntarse si la acción de NEP1-40 sería realmente NgR1-específica, lo cual sería objetivo de nuevos estudios.

Los resultados obtenidos con parte de esta tesis doctoral indican que, el bloqueo de la quinasa ERK1/2 mediante el uso de un inhibidor específico no incrementa el crecimiento neurítico de las CGNs que crecen sobre mielina transcurridas 24h, y por otro lado refuerza la idea de la existencia de un efecto transitorio de NgR1 inhibiendo el crecimiento causado por la presencia de las

MAIs (Chivatakarn et al., 2007), desencadenando su señalización principalmente tras el primer contacto con las moléculas inhibitorias, y dejando paso a un papel principal de otros inhibidores tras una exposición más prolongada a los mismos.

Por otra parte, a través de la utilización de CGNs obtenidas a partir de animales *knock-out* para el NgR1 (*NgR1*^{-/-}) hemos observado que se produce un incremento en la longitud neurítica en las neuronas mutantes en comparación con cultivos paralelos de neuronas provenientes de animales *wild type* (*NgR1*^{+/+}). Además, la longitud de las neuritas de las CGNs que han sido tratadas con los inhibidores de GSK3 β es similar a la observada en las neuronas *NgR1*^{-/-} y *NgR1*^{+/+} que crecen sobre Poly D-lisina (condición control). Esto implica la participación de otros receptores además del NgR1 en la activación de GSK3 β inducida por las MAIs y que ERK1/2 y GSK3 β estarían activadas por vías intracelulares independientes en las CGNs. Al respecto, ya ha sido descrita la participación de EGFr en la activación de ERK1/2 tras el tratamiento con MAIs y mediante un proceso de transactivación (Koprivica et al., 2005)

Cultivos organotípicos Entorrino-Hipocámpicos (EH)

En el caso de los organotípicos EH hemos descrito como tras axotomía, tiene lugar una regulación al alza de las MAIs (a excepción de Nogo-A) observada tanto a través del uso de *microarrays* y validación por *Western blotting*, corroborando estudios anteriores de nuestro grupo (Mingorance et al., 2005, Mingorance et al., 2006). Sin embargo, debemos distinguir entre las respuestas temprana y tardía tras la lesión de la vía EH en lo que respecta al análisis de las principales quinasas implicadas en nuestros estudios.

Como bien hemos demostrado, GSK3 β permanece activa (en menor o mayor grado) en los cultivos lesionados en todas las condiciones post-lesión mientras que en el caso de la activación de ERK1/2, ésta únicamente permanece activa en el periodo de tiempo inicial que sigue a la lesión y decrece pasados diversos

días *in vitro* (especialmente a los 3 y 12 DAL). Esta activación temprana de ERK1/2 tras la lesión podría atribuirse a la activación de la glía reactiva en la zona de la lesión, como bien hemos sugerido. La participación de NgR1 en la activación de ERK1/2 es plausible ya que se ha demostrado que existe un incremento en la inmunoreactividad de NgR1 de los astrocitos reactivos tras lesión en el SNC, y además se ha visto que el EGFr estaría también involucrado en las respuestas mediadas a través del NgR1 (Koprivica et al., 2005, Satoh et al., 2005). El receptor de EGF se sobre expresa en astrocitos tras lesión y promueve su transformación en astrocitos reactivos (Liu et al., 2006b, Codeluppi et al., 2009). Además, otros estudios han demostrado que el inhibidor de EGFr, PD168393; mejora la regeneración axonal en el nervio óptico dañado y promueve la recuperación tras lesión de la medula espinal (Erschbamer et al., 2007). En estos estudios, los inhibidores de EGFr podrían reducir la activación de las MAPK, disminuyendo la reactividad glial y la liberación de moléculas inhibitorias que dificultan el recrecimiento axonal. (ej. CSPG) (Erschbamer et al., 2007). Un estudio de Rhodes y colaboradores estableció que la reducción de la proliferación de la cicatriz glial mediante el tratamiento temporal con *cytosine-D-arabino-furanoside (Ara-C)* incrementaba el número de axones regenerativos tras lesión del SNC, efecto que disminuye pasados 18 días tras la lesión (Rhodes et al., 2003). Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor selectivo de EGFr aplicado en el trabajo de Erschbamer y colaboradores fue solamente efectivo a tiempos cortos tras la lesión (Erschbamer et al., 2007).

Por lo tanto, sería interesante determinar si este tratamiento es también útil en una situación en la que la aplicación del inhibidor tuviese lugar con cierto margen de retraso tras la lesión, momento en el que desaparece una activación relevante de ERK1/2. Por otro lado, aunque el desarrollo de la conexión de la vía EH en los animales *NgR1*^{-/-} es normal (no mostrado en resultados), esta no es capaz de regenerar de manera espontánea tras lesión. Este hallazgo también ha sido descrito para el tracto cortico-espinal *in vivo* (Zheng et al., 2005). A pesar de ello, los axones de la vía EH sí son capaces de regenerar tras la inhibición de GSK3 β en los co-cultivos de EH de animales *NgR1*^{-/-}, tal i como se muestra en el Capítulo II de resultados.

A pesar de la existencia de numerosas discrepancias sobre el tema de la capacidad regenerativa en animales mutantes para diferentes ligandos o bien receptores, parece claro que los ratones portadores de mutaciones simples, dobles e incluso triples no muestran una regeneración lo suficientemente robusta, demostrando que la inhibición axonal depende en gran medida del tipo de ligando/receptor y de las diferentes vías de señalización intracelulares implicadas. No obstante, nuestros resultados también indican que GSK3 β permanece activa en cultivos *NgR1*^{-/-} y que dos inhibidores selectivos de GSK3 β (SB-41528 y SB-216763) son capaces de aumentar la regeneración axonal tras la axotomía de la vía EH de los cultivos organotípicos. Así pues, la caracterización de los factores celulares responsables de la activación de GSK3 β en los cultivos *NgR1*^{-/-} garantiza estudios adicionales.

Por ejemplo, las Semaforinas secretables ya se ha demostrado que desencadenan la activación de diversas quinasas incluyendo GSK3 β (Ahmed and Eickholt, 2007). Esta evidencia podría ser de gran relevancia en la activación retardada de GSK3 β observada tras la axotomía de la EHP, estando además correlacionada con el incremento de la expresión de las semaforinas en la vía EH lesionada *in vitro* (Montolio et al., 2009).

II. ¿GSK3 β clave en la regeneración axonal?

GSK3 β parece estar ejerciendo un papel clave en la señalización asociada a la neuroregeneración; no obstante son notables las discrepancias que existen entre los, no muy numerosos, trabajos y grupos que han profundizado en ello; en lo que se refiere a su grado de activación y a cuales de sus dianas asociadas (dianas del citoesqueleto u otras quinasas) se ven afectadas durante una situación de inhibición del crecimiento axonal tras lesión.

Algunos estudios sugieren que la supresión de la actividad GSK3 β es requisito indispensable para la formación y la extensión axonal (Zhou et al., 2004, Jiang et al., 2005, Yoshimura et al., 2005), pero por otro lado otros estudios muestran que la inhibición de GSK3 β provoca el efecto contrario, evitando la extensión

axonal (Owen and Gordon-Weeks, 2003). De hecho, los estudios hasta ahora existentes parecen indicar que la inhibición de la señalización dependiente de GSK3 β es esencial para promover el ensamblaje microtubular en el cono de crecimiento (Kim and Kimmel, 2006). En los últimos años, se ha propuesto que la inhibición de GSK3 β es a la vez, capaz de incrementar y bloquear el axón de crecimiento dependiendo de los sustratos involucrados en el proceso y el grado de inhibición de la GSK3 β (Kim et al., 2006, Hur et al., 2011).

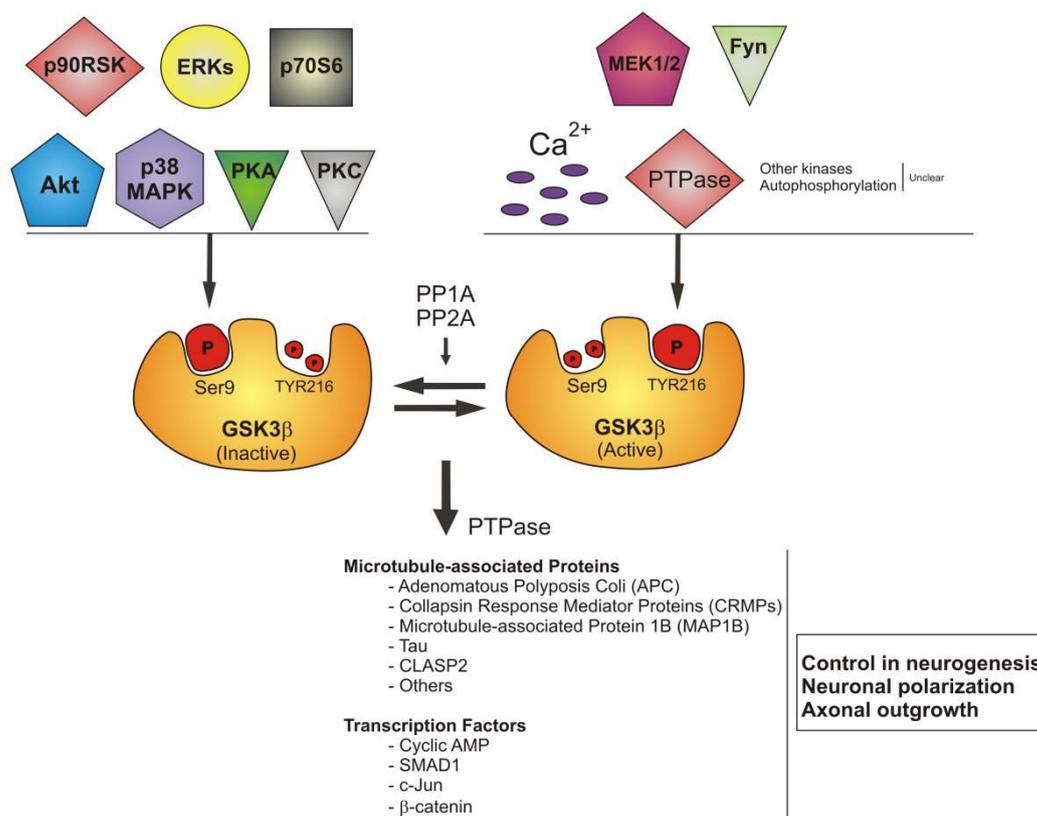


Figura 1. Regulación y dianas de GSK3 β . GSK3 β está sujeta múltiples mecanismos de regulación y su fosforilación en Serina9 sea, probablemente, uno de los más importantes. Diversas quinasas son capaces de mediar su modificación entre las que se incluyen p70S6, *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), p90Rsk (o *MAPKAP kinase-1*), AKT, ciertas isoformas de la proteína quinasa C (PKC), y la *cyclic AMP-dependent protein kinase* (PKA). La fosforilación en Tirosina 216 se sabe está mediada por alteración en los niveles intracelulares de calcio, por la *calcium-dependent tyrosine kinase*, *proline-rich tyrosine kinase 2* (PYK2), o por Fyn, un miembro de la familia Src. Además, está sujeta también a la regulación por la *mitogen-activated protein kinase* (MEK1/2) y PTPasas. Las protein fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A) también regulan los niveles de fosforilación de GSK3 β . Por otro lado, el control de la actividad GSK3 β actuará sobre la neurogénesis, la polarización neuronal y el crecimiento axonal, a través de sus principales dianas celulares (Hughes et al., 1993, Shaw et al., 1997, Bhat et al., 2000, Kaytor and Orr, 2002, Luo, 2009)

Muchos de los sustratos de GSK3 β son proteínas de la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) entre las que se incluye la *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), *Collapsin Response Mediator Proteins* (CRMP2), *Microtubule-Associated Protein 1B* (MAP1B), TAU y más recientemente las *Cytoplasmic Linker Proteins (CLIP)-associated protein* (CLASP2) (ver (Goold and Gordon-Weeks, 2004, Jope and Johnson, 2004, Zhou and Snider, 2005, Hur et al., 2011)), así como factores de transcripción y otras posibles quinasas asociadas con las modificaciones del citoesqueleto (Figura 1). Con todo, lo que parece claro es el papel de GSK3 β , cuya actividad estaría claramente involucrada en proceso de regeneración axonal. Sin embargo, el conocimiento pleno de los mecanismos transduccionales a través de los cuales se induce la inhibición del crecimiento axonal continúa, en gran medida, desconocido.

Tal y como ya hemos comentado en la Introducción, a pesar de la existencia de numerosos factores intrínsecos como la incapacidad de las propias neuronas adultas de reiniciar sus programas de crecimiento neurítico tras lesión; los factores extrínsecos relacionados con la cicatriz glial formada en el lugar de la lesión son la principal razón del fallo de la regeneración axonal en el SNC.

De entre los factores extrínsecos, podemos distinguir la cicatriz glial en sí misma, las proteínas inhibitorias no asociadas a la mielina y finalmente las proteínas inhibitorias asociadas a la mielina (MAIs) tal i como ha sido descrito en detalle en la introducción. Además, éstas últimas, estarían actuando principalmente a través del *Nogo Receptor Complex 1* (NgR1) (Wang et al., 2002a, Mi et al., 2004, Park et al., 2005, Shao et al., 2005). Aunque, también tenemos que tener en cuenta la aparición de nuevos receptores como el recientemente descrito *Paired immunoglobulin-like receptor B* (PirB) y algunos miembros de la familia de las integrinas entre otros (Atwal et al., 2008, Hu and Strittmatter, 2008).

Por ejemplo, tras lesión, los CSPGs son rápidamente secretados y permanecen retenidos en el área lesionada durante meses, dando lugar a una inhibición del crecimiento axonal y produciendo el colapso del cono de crecimiento (Carulli et

al., 2005, Seira et al., 2010). Por ejemplo, los CSPGs poseen una fuerte capacidad inhibitoria sobre los axones embrionarios de las neuronas ganglionares de la raíz dorsal (Sandvig et al., 2004). Los efectos en la inhibición axonal puede ser mitigada utilizando la encima bacteriana, *chondroitinase ABC* (Kwok et al., 2008). De hecho, el tratamiento sinérgico con ChABC y LiCl (inhibidor de GSK3 β) refuerza el efecto sobre la regeneración axonal del tracto rubroespinal (RST) (Yick et al., 2004). También, Bcl-2 juega un papel importante en la promoción de la regeneración de axones dañados en el SNC (Chen et al., 1997, Sole et al., 2004). El LiCl incrementa la regeneración axonal de las células ganglionares de la retina a través de un mecanismo dependiente de Bcl-2 (Huang et al., 2003). En conjunto, parece pues demostrarse que claramente, el LiCl no es un tratamiento específico para la inhibición de GSK3 β .

Dos trabajos recientemente publicados han identificado a la proteína transmembrana *Protein Tyrosine Phosphatase σ* (PTP σ) (Shen et al., 2009) y la *Leukocyte Common Antigen-Related Phosphatase* (LAR) (Fisher et al., 2011) como receptores de CSPGs. Los efectos de los CSPGs y las MAIs está bien establecido que convergen en la activación de la GTPasa RhoA. Pero muy recientemente, Fisher y colaboradores han mostrado que, además se produce una reducción significativa de la fosforilación de AKT tras el tratamiento con CSPGs en cultivos de CGNs (Fisher et al., 2011). Esta disminución de la fosforilación se traduciría en una menor actividad de la quinasa AKT y por lo tanto podría estar directamente relacionada con un incremento de la actividad GSK3 β , una de sus principales dianas. En sintonía con estos resultados, Gao y colaboradores habían demostrado que el tratamiento con Amphotericina B, un antibiótico fúngico poliénico (Brajtburg et al., 1990), inducía un incremento del proceso regenerativo, y que en este incremento intervendría la activación en neuronas de AKT, tras la estimulación con CSPGs (Gao et al., 2010a); demostrando que realmente otros componentes derivados de la mielina podrían estar afectando a GSK3 β a través de diversos conocidos o, todavía desconocidos, receptores (ej. Integrinas, PirB, PTP σ , LAR).

Con respecto a la posibilidad de la participación, prácticamente asegurada, de otros receptores que podrían afectar a la actividad de GSK3 β , o bien al efecto de nuevas o no tan nuevas moléculas liberadas en la zona de lesión; no podemos olvidarnos de los miembros de la familia de las semaforinas. Las semaforinas que han sido de manera tradicional relacionadas con la modulación de los procesos de guía axonal durante el desarrollo embrionario, se ven expresadas en la cicatriz glial tras la lesión, lo que les otorga, en primera instancia, la facultad de poseer nuevos roles en dicho contexto (de Wit and Verhaagen, 2003). Por ejemplo, varias semaforinas inhibitorias han sido asociadas anteriormente con procesos inhibitorios. Las Semaforinas 4D y 7A se sobreexpresan en el área lesionada tras lesión medular (Moreau-Fauvarque et al., 2003, Pasterkamp et al., 2007); la Semaforina 6B es sobreexpresada tras la transección del fornix en ratas (Kury et al., 2004) y la Semaforina 5A es capaz de inducir colapso del cono de crecimiento y inhibición del crecimiento axonal en axones de la retina (Goldberg et al., 2004). Cuando la Semaforina 3A (semaforina secretable) puede bloquearse con el tratamiento con un peptido específico en cultivos organotípicos en los que la vía EH ha sido axotomizada, se produce regeneración axonal hacia el hipocampo (Montolio et al., 2009). Todas estas evidencias sugieren que, como ocurre en el caso de la Semaforina 6C, la Semaforina 3A y otras semaforinas inhibitorias podrían estar actuando a través de la vía de señalización de GSK3 β para promover los efectos inhibitorios en el crecimiento axonal tras axotomía de la EHP en dicho modelo de cultivo organotípico (Burgaya et al., 2006, Montolio et al., 2009). Por lo tanto, las Semaforinas secretables ya se ha demostrado que desencadenan la activación de diversas quinasas incluyendo GSK3 β (Ahmed and Eickholt, 2007). Esta evidencia podría ser de gran relevancia en la activación retardada de GSK3 β observada tras la axotomía de la vía EH en nuestros cultivos organotípicos; estando además correlacionada con el incremento de la expresión de las semaforinas en la vía EH lesionada *in vitro* (Montolio et al., 2009).

Finalmente, al igual que las proteínas no asociadas a la mielina, hemos podido comprobar, tal i como mostramos en los resultados de esta tesis y como

demuestran otros grupos, que las MAIs o bien se mantienen o están sobre expresadas tras lesión (Hunt et al., 2002a, Meier et al., 2003, Mingorance et al., 2004, Seira et al., 2010); siendo esta sobreexpresión no únicamente focalizada alrededor de la cicatriz glial. Estos hechos otorgan el papel de ser una de las principales moléculas implicadas en la prevención del crecimiento axonal a las MAIs.

a. *GSK3 β* y el crecimiento axonal: *GSK3 β* en la modificación del citoesqueleto neuronal

El crecimiento axonal es solamente uno de los diversos cambios que sufren las neuronas a lo largo de su vida, siendo esos cambios esenciales para conseguir la correcta formación de las complejas conexiones neuronales del cerebro durante el desarrollo embrionario. Es por ello que, entender los mecanismos que controlan esos eventos puede darnos nuevas pistas necesarias para comprender cómo las neuronas pierden su funcionalidad con el paso de la edad, la enfermedad o bien en situaciones de lesión o daño.

Junto con diversas proteínas estructurales (ej. MAPs, en el caso de los componentes microtubulares); la actina y los microtúbulos son los principales componentes del citoesqueleto neuronal. Todos estos componentes están regulados por numerosas quinasas entre las que encontramos la GSK3 β .

Por ejemplo en lo referente al citoesqueleto de actina, uno de los reguladores de la RhoGTPasa, la proteína p190 RhoGAP, identificada como proteína activadora de GTPasa (GAP) para los miembros de la familia de las RhoGTPasas (Settleman et al., 1992), se ha descrito como una nueva diana de GSK3 β en modelos de células adherentes. Los fibroblastos que carecen de la isoforma p190A RhoGAP muestran una acumulación de Actina-F en los *leading edges* afectando a la polarización celular y finalmente a su migración. Cuando el genotipo de la células es recuperado mediante la incorporación de la proteína *wild type* los defectos son restaurados. Por el contrario, tras la inserción de una forma mutante de la proteína, la cual carece del sitio de fosforilación por GSK3 β , los defectos se mantienen (Jiang et al., 2008).

APC y CRMP2 son dos de los sustratos de GSK3 β asociados al ensamblaje microtubular cuya fosforilación por parte de GSK3 β suprime su unión a los microtúbulos (*primed substrates*) (Tanaka and Kirschner, 1995, Yoshimura et al., 2005). La *Cyclin-dependent kinase 5* (Cdk5) es capaz de fosforilar CRMP2 y CRMP4 pero, solamente CRMP4 necesita de una previa fosforilación por parte de DYRK2 antes de la fosforilación por parte de GSK3 β (Kim et al., 2006). La inhibición de GSK3 β conduce a la reducción de la fosforilación de CRMP2 y el incremento del crecimiento axonal (Kim et al., 2006) (Figura2).

Por otro lado, MAP1B es un *unprimed substrate* de GSK3 β cuya fosforilación incrementa el dinamismo microtubular permitiendo la exploración eficiente del espacio extracelular y la correcta respuesta a las señales extracelulares, actividades esenciales para el crecimiento y la retracción axonal (Dent and Gertler, 2003, Trivedi et al., 2005, Zhou and Snider, 2005). En el caso de la proteína TAU, GSK3 β parece ser la principal quinasa implicada en su fosforilación (Li et al., 2006) (Figura 2). Además, GSK3 β está asociada a los microtúbulos vía TAU (Sun et al., 2002). TAU posee una singularidad como sustrato que es motivo de discusión. Esta singularidad es su comportamiento dual como *primed* o *unprimed substrate* dependiendo de los epítomos con los que trabajamos (Leroy et al., 2010). La *protein kinase A* (PKA) y Cdk5 son dos ejemplos de quinasa implicadas en la fosforilación previa a la acción de GSK3 β (Leroy et al., 2010).

A pesar de que queda mucho trabajo por hacer, estas propiedades han permiten creer en su función clave en el proceso general de inhibición del crecimiento axonal, actuando sobre las principales MAPs u otras proteínas directa o indirectamente relacionadas con el citoesqueleto neuronal tanto de actina como microtubular.

b. Controvertida participación de GSK3 β en la inhibición del crecimiento axonal

En los últimos 5 años, GSK3 β ha empezado a tomar cierta relevancia como quinasa en el complejo y no muy bien conocido entramado que es la inhibición del crecimiento axonal. A pesar de ello no son muchos los trabajos que se han publicado al respecto y que otorgan a GSK3 β un papel clave dentro de todo el proceso. Son diversos los grupos que han decidido profundizar más en el conocimiento de la vías de señalización causantes del efecto inhibitorio, y específicamente algunos de ellos se han focalizado en el estudio del papel de la GSK3 β en todo el entramado. Aunque los resultados obtenidos hasta el momento (entre los cuales se encuentran los nuestros) parecen ir en sintonía con la idea de que GSK3 β incrementaría su actividad tras lesión del SNC (Dill et al., 2008, Seira et al., 2010), el trabajo de Alabed y colaboradores muestra resultados muy divergentes (Alabed et al., 2010) (Figure 2).

Tal y como hemos ido resumiendo anteriormente, existen evidencias que apoyan que GSK3 β es crucial para el establecimiento de la ramificación axonal y de su elongación (Zhou and Snider, 2005, Garrido et al., 2007). De manera coherente, la inactivación de GSK3 β inducida por NGF a través de la vía de la PI3K, mejora la actividad de la proteína APC, proteína de unión a microtúbulos requerida para el crecimiento axonal (Zhou et al., 2004). Además, PI3K parece ser esencial para la elongación neurítica y su posterior mantenimiento, ya que su inhibición provoca la retracción neurítica a través de una activación de GSK3 β y la consecuente hiperfosforilación de TAU (Sanchez et al., 2001, Liu et al., 2003a).

Las primeras evidencias que sugieren un incremento de la actividad GSK3 β fueron algunos estudios que utilizaban LiCl como inhibidor de su actividad (Goold et al., 1999, Takahashi et al., 1999, Bhat et al., 2004, Williams et al., 2004). Como hemos comentado anteriormente, el tratamiento combinado con LiCl y condroitinasa ABC (Yick et al., 2004) indujo la regeneración de los axones de la células ganglionares en la retina y en el tracto rubrospinal (Yick et al., 2004, Dill et al., 2008). Los efectos observados se correlacionaban con un incremento de la actividad de GSK3 β , pero todavía no está del todo claro si esos resultados son debidos completamente al efecto inhibitorio de LiCl sobre

GSK3 β o, el LiCl estaría también actuando sobre otras quinasas y/o factores que promueven, por ejemplo, la supervivencia celular como se ha demostrado en algunos estudios (Victoratos et al., 1997, Feinstein, 1998, Yick et al., 2004, Wada et al., 2005). Contrariamente, varios trabajos indican que la inhibición de GSK3 β decrece la extensión neurítica y produce un incremento en la ramificación tanto en CRGs como DRGs (Lucas et al., 1998, Goold and Gordon-Weeks, 2005). Entonces, parece claro que LiCl no es un buen inhibidor específico para GSK3 β (Pardo et al., 2003) y por tanto, podría estar afectando otras quinasas o componentes tras el tratamiento, no clarificando el papel real de GSK3 β en la regeneración axonal. Al respecto, se han desarrollado otros inhibidores altamente selectivos para la inhibición de GSK3 β y para evitar posibles efectos indirectos, el SB-415286 y SB-216763 (Coghlan et al., 2000, Smith et al., 2001, Meijer et al., 2004). También, las aminopirimidinas (análogos de las purinas) como el CT99021 parecen inhibir GSK3 β a concentraciones en el rango nanomolar (Ring et al., 2003, Bain et al., 2007).

Por otro lado, el uso de modelos *knockout* podría ser una aproximación muy útil para intentar entender mejor el papel de las diferentes quinasas que se supone están involucradas en las vías de señalización *downstream* al efecto de las moléculas inhibitorias del crecimiento neurítico. Por ejemplo, en el caso de GSK3 β existen algunas dificultades en cuanto al uso de animales mutantes debido a que la delección del gen de GSK3 β en ratones se ha visto es letal. Solamente los animales heterocigotos sobreviven aunque mostrando un gran rango de desordenes neurológicos (O'Brien et al., 2004, Kimura et al., 2008). Contrariamente, los ratones que carecen de GSK3 α son viables y relativamente normales (MacAulay et al., 2007)

Como ya hemos comentado existen tres estudios que relacionan la actividad GSK3 β con los efectos inhibitorios sobre el crecimiento axonal debidos a las proteínas MAIs u otras proteínas inhibitorias tras lesión en el SNC. De manera más específica, dos de los trabajos que relacionan directamente a GSK3 β con los efectos de inhibición axonal asocian estos efectos a un incremento de su actividad tras la estimulación con mielina, y la proteína recombinante *Alkaline*

Phosphatase-Nogo66 loop (Seira et al., 2010) o bien al estímulo con CSPGs y MAG (Dill et al., 2008); mientras que el tercero de los trabajos indica una disminución en la actividad de GSK3 β tras el tratamiento con mielina, el péptido inhibitorio Nogo-p4 (residuos 31-55 del *loop* inhibitorio Nogo66) (GrandPre et al., 2000), o OMgp (Alabed et al., 2010) (Figura 2).

Dill y sus colaboradores demostraron como, la estimulación aguda de células PC12 y Neuronas Granulares del Cerebelo (CGNs) por CSPGs, inicialmente disminuía la fosforilación de AKT y de GSK3 β en el epítipo Serina 9 (inhibitorio), pero observaron que no ocurría lo mismo con la estimulación con MAG (Dill et al., 2008). Por otro lado, incrementando los tiempos de incubación, como en nuestro caso, podemos observar cómo se produce una importante reducción de la fosforilación de AKT tras estimular con AP-Nogo66, que a su vez está perfectamente correlacionada con el patrón de activación de GSK3 β que observamos tras la estimulación con mielina. El menor grado de fosforilación de AKT lo observamos a los 90 minutos tras la estimulación, lo que encaja perfectamente con la mayor actividad de GSK3 β analizada mediante los ensayos de radioactividad (Seira et al., 2010). Tanto nuestros resultados como los obtenidos por el grupo de Dill y colaboradores muestran como se produce un incremento en la extensión neurítica en CGNs cultivadas sobre sustratos inhibitorios cuando la actividad de GSK3 β es inhibida mediante inhibidores selectivos (Figura 2).

En nuestro caso, el análisis en paralelo del patrón de actividad de ERK1/2 en CGNs, nos sugiere un efecto agudo inicial de ERK1/2 tras la estimulación con moléculas inhibitorias, confirmando a GSK3 β el rol principal en la fase crónica, como ya hemos sugerido con anterioridad.

Con el objetivo de determinar los efectos funcionales de la inhibición de GSK3 β tras lesión, Dill y colaboradores utilizaron los siguientes modelos de SCI; contusión, transección unilateral y transección dorsal de la medula espinal. Observaron como el tratamiento sistémico de la medula espinal lesionada con LiCl o SB-415286 incrementa el *sprouting* y el crecimiento axonal de los axones

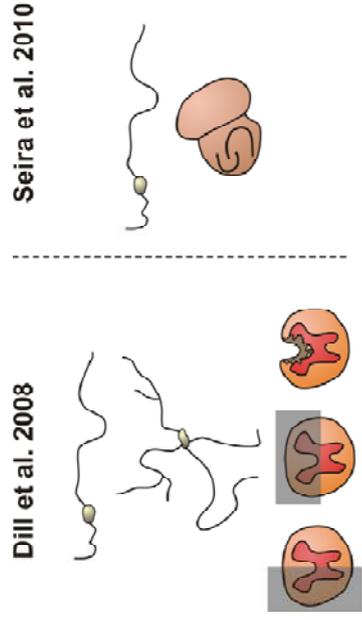
del tracto corticoespinal (CST) y rabrespinal, específicamente en los modelos de transección dorsal y de contusión (Dill et al., 2008). Demostrando, además, una recuperación en el comportamiento locomotor (Dill et al., 2008).

De manera similar pero *in vitro*, nuestros resultados en cultivos organotípicos de la vía EH axotomizados revelan que GSK3 β permanece activa algunos días tras la lesión (12 días); así pues el análisis del estado de activación de GSK3 β en médulas lesionadas debería ser analizado. El tratamiento de los organotípicos axotomizados con inhibidores de GSK3 β (SB-415286 y SB-216763) promueven un crecimiento axonal muy significativo a través de la región lesionada, que en comparación es más importante que el observado por el trabajo de Dill y colaboradores (Seira et al., 2010).

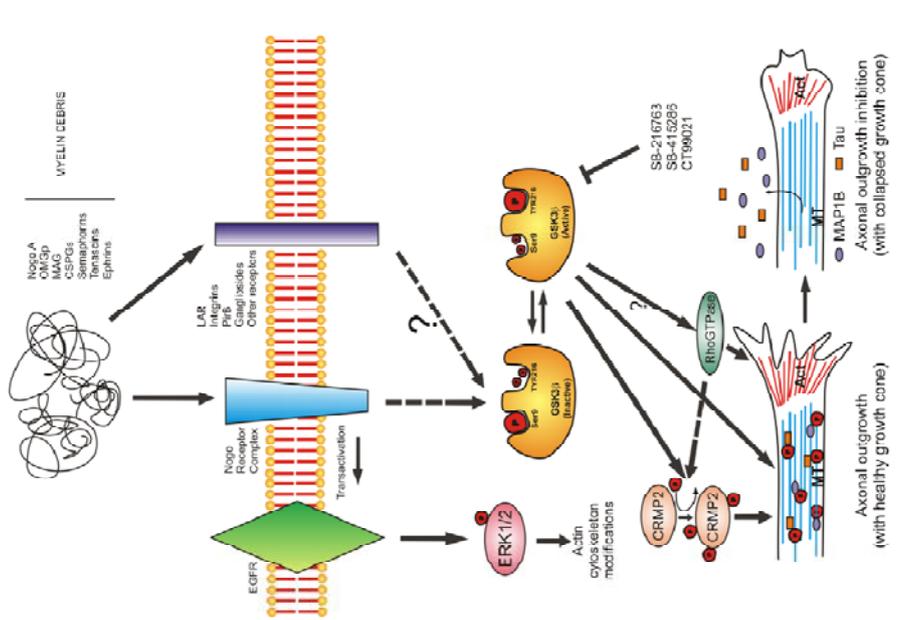
Por otro lado, Alabed y colaboradores muestran que GSK3 β es regulada negativamente y por tanto inactivada tras el estímulo directo con las MAIs (Alabed et al., 2010). El tratamiento de cultivos de CGNs y DRGs (cultivados sin la presencia de ningún substrato inhibitorio) con inhibidores de GSK3 β induce la inhibición del crecimiento neurítico. Esta inhibición es probablemente debida a la necesidad de un grado de fosforilación y actividad basal por parte de GSK3 β para promover de esa manera un crecimiento axonal correcto (Kim et al., 2006); entonces una inhibición extrema podría dar como resultado una inhibición sobre el crecimiento neurítico estándar mientras que una inhibición débil promovería la ramificación axonal (Krylova et al., 2002, Owen and Gordon-Weeks, 2003, Kim et al., 2006). Así pues parece ser que una inhibición excesiva de GSK3 β daría como resultado una alteración en el crecimiento normal de las neuronas (Zhang et al., 2011).

De manera específica, el trabajo de Alabed y colaboradores muestra como GSK3 β -Serina 9 es fosforilada tras estimulación aguda (corto tiempo) con OMgp y el péptido Nogo-P4 en CGNs y células PC12 (GrandPre et al., 2000, Alabed et al., 2007).

Figura 3. Esquema de los modelos propuestos para el papel de GSK3β en la inhibición del crecimiento axonal. Alabed y colaboradores apoyan la teoría de que tras la activación del complejo *Nogo Receptor* u otros receptores por la mielina, la señalización conduce a la fosforilación del epítipo inhibidor (Ser9) de GSK3β. La actividad basal de GSK3β promueve la defosforilación de L-CRMP4 que actúa a través de la interacción con RhoA. El uso de C4RIP (CRMP4-RhoA *interfering peptide*) muestra un incremento en la longitud neurítica. Entonces el uso de inhibidores contra GSK3β da lugar a una inhibición del crecimiento axonal. Por otro lado, nuestro trabajo aquí expuesto (Seira et al. 2010) y el trabajo de Dill y colaboradores apoya la idea de un incremento de actividad GSK3β tras el estímulo con mielina. Entonces, GSK3β actuaría directamente sobre las proteínas MAP. En ese caso, GSK3β también estaría actuando a través de un miembro de la familia CRMPs, el CRMP2, promoviendo su fosforilación, la cual contribuye a la desestabilización microtubular. Al respecto, la RhoGTPasa podría facilitar esa fosforilación. Entonces, inhibiendo GSK3β con inhibidores altamente selectivos se incrementaría el crecimiento axonal. Probablemente una de las razones de los diferentes resultados obtenidos por los grupos sea las diferencias entre los modelos usados tal y como ya ha sido comentado en el texto.



Models
Signalling Pathway



c. Miembros del citoesqueleto: la familia de las CRMPs

Los resultados de esta tesis muestran como el incremento de la actividad GSK3 β tras lesión estaría directamente correlacionado con una afectación en el citoesqueleto neuronal, lo cual daría lugar a la consiguiente alteración del crecimiento neurítico. Hemos observado cómo, de forma clara, la proteína TAU así como la MAP1B, principales dianas microtubulares de GSK3 β , presentan un patrón de fosforilación que se corresponde con el patrón de actividad de la GSK3 β . Estos resultados ayudan a apoyar con una mayor fuerza la implicación de GSK3 β como quinasa clave en la señalización de la vía inhibitoria del crecimiento axonal y también al papel clave de las proteínas asociadas al citoesqueleto neuronal en todo el proceso. El resultado final de esa mayor actividad de GSK3 β y el posterior incremento de fosforilación sus dianas resultaría en una desestabilización del citoesqueleto microtubular y una promoción de la retracción neurítica, como ya había sido descrito anteriormente (Nuydens et al., 1997, Cuchillo-Ibanez et al., 2008)

A pesar de que en nuestro trabajo no hemos realizado ningún análisis del estado de las proteínas de la familia CRMP, un breve análisis de la situación en la que se encuentra el estudio de su relación con la modificación del citoesqueleto neuronal tras inhibición por mielina, nos ha parecido importante para entender mejor el papel general de GSK3 β en todo el proceso.

Estudios previos han asociado el mayor grado de activación de GSK3 β con modificaciones en otra proteína asociada a microtúbulos como es la CRMP2 (Yoshimura et al., 2005). Yoshimura y colaboradores probaron como la proteína CRMP2 no fosforilada promovía el crecimiento axonal en neuronas del hipocampo (Yoshimura et al., 2005). La capacidad de unión a tubulina de CRMP2 disminuye tras la fosforilación por GSK3 β , que ayuda todavía más a dar validez a la hipótesis de un incremento de la actividad de GSK3 β asociada a los estímulos inhibitorios producidos tras la lesión. Además, la quinasa Rho tiene la capacidad de regular la interacción de las CRMP2 con la tubulina,

promoviendo el colapso del cono de crecimiento frente a señales inhibitorias como por ejemplo la EphrinaA (Arimura et al., 2000). La activación de la quinasa Rho sería también la responsable de la fosforilación y de su pérdida de capacidad de unión a tubulina (Arimura et al., 2000) (Figura 2).

Contrariamente a lo expuesto anteriormente Alabed y colaboradores, han demostrado que los efectos inhibitorios de GSK3 β no estarían mediados a través de CRMP2, sino que lo harían a través de CRMP4, otro de los miembros de la familia de las CRMPs (Alabed et al., 2010). Respecto a dichos resultados, sólo existe un trabajo que apoya los resultados demostrando una regulación directa de GSK3 β sobre CRMP4 pero en células HeLa y durante el proceso de alineamiento cromosómico (Ong Tone et al., 2010), mientras que la relación entre GSK3 β y CRMP2 está mucho más consolidada (Uchida et al., 2005, Cole et al., 2006, Cole et al., 2007, Soutar et al., 2009, Hur et al., 2011, Williamson et al., 2011). Estos efectos antagonistas de los miembros de la familia de las CRMPs podrían ser comunes tal y como ya ocurre con algunos miembros de la familia de E2F (Frolov et al., 2001). De hecho, el comportamiento diferencial (*unprimed* o *primed substates*) frente a diversas quinasas previa su fosforilación por parte de GSK3 β , podría explicar en parte las diferencias observadas entre CRMP2 y CRMP4. Así pues, CRMP2 y CRMP4 son fosforiladas por Cdk5 mientras que CRMP4 únicamente lo es por DYRK2 (Cole et al., 2006). Aunque ambas proteínas son capaces de incrementar la longitud neurítica en neuronas del hipocampo de rata, CRMP4 es menos eficiente (Cole et al., 2006). El trabajo de Cole y colaboradores muestra como la fosforilación de CRMP2 (no la de CRMP4) por GSK3 β está involucrada en el colapso del cono de crecimiento debido al estímulo con la Semaforina inhibitoria, Semaforina 3A (Uchida et al., 2005, Cole et al., 2006). Entonces, parece que la activación diferencial de las *priming kinases* frente a los estímulos que inhiben el crecimiento neurítico también deberían ser considerados y profundamente analizados en futuros estudios en relación con la familia de proteínas CRMPs así como de TAU o MAP1B entre otras.

Según Alabed y colaboradores, CRMP4 estaría actuando a través de su interacción con RhoA (Figura 2), más concretamente, sería la forma L-CRMP4 la que tendría el papel clave en el proceso. La infección de las neuronas DRG con el péptido interferente para la unión L-CRMP-RhoA, C4RIP, la disminución de la longitud neurítica es atenuada, probablemente debido al descenso en el grado de fosforilación de L-CRMP4. L-CRMP4 sería requerida para la inhibición del crecimiento neurítico gracias a la disminución de la actividad GSK3 β . Además, la sobreexpresión del constructo GSK3 β S9A, forma constitutiva y activa de GSK3 β , permite la reducción de los efectos de Nogo-P4 sobre la defosforilación de L-CRMP4 (Alabed et al., 2010). A pesar de ello en esa dirección, existen algunas evidencias que demuestran que el simple hecho de realizar la infección de formas constitutivamente activas de GSK3 β produce deficiencias en el crecimiento normal de los axones (Munoz-Montano et al., 1999).

d. Diversidad de condiciones y modelos: diversidad de resultados

Analizando en profundidad nuestros resultados y los resultados obtenidos por los otros dos trabajos principales sobre los que hemos estado discutiendo hasta el momento, podemos observar importantes diferencias en el planteamiento de los experimentos como por ejemplo es el uso de diferentes modelos neuronales o inhibidores.

Es más que probable que algunas de las diferencias observadas entre los resultados sean debidas al uso de diferentes modelos neuronales para la realización de los experimentos. Tanto Alabed y colaboradores como Dill y colaboradores utilizan el modelo de neuronas del DRG (Dill et al., 2008, Alabed et al., 2010). Con respecto al uso de este modelo, Wang y Strittmatter habían ya descrito como el mRNA de CRMP2 estaba presente en grandes cantidades en CRGs. Contrariamente, no existía presencia del mRNA de CRMP4 en ese mismo tipo neuronal; sin embargo ambos mRNAs se localizaban en las neuronas del DRG (Wang and Strittmatter, 1996).

Otros factores a considerar son el origen y la edad de las neuronas analizadas. Las diferencias en el periodo de aparición de la expresión de diferentes receptores, quinasa etc., determinará diferencias importantes entre las respuestas de las neuronas a diferentes estímulos, como por ejemplo a las MAIs (Ng and Lozano, 1999). Estos dos últimos factores podrían explicar también las diferencias observadas entre los trabajos de Alabed y Dill, que utilizan el mismo modelo neuronal (DRGs) y las mismas concentraciones de drogas inhibitoras para la GSK3 β , y entre cuyas diferencias más importantes se encuentran el origen y la edad de las neuronas utilizadas. Tanto es así, que los resultados obtenidos al inhibir GSK3 β en cultivos de DRGs que crecían sobre sustratos inhibitorios, fueron totalmente opuestos (Dill et al., 2008, Alabed et al., 2010).

Además, tenemos que tener en cuenta, que la fosforilación de las proteínas CRMPs por GSK3 β requiere de una fosforilación previa por otras quinasas, tal y como hemos comentado; y que esas quinasas involucradas en la fosforilación previa podrían variar entre diferentes tipos celulares o tejidos.

Por lo tanto, en conjunto nuestros resultados y estos trabajos estarían íntimamente relacionados con el trabajo de Kim y colaboradores en el que se muestra como diferentes niveles de inhibición de GSK3 β ; y, por ejemplo, el uso de diferentes tipos de inhibidores sobre neuronas DRGs, podría ser una de las principales causas de las discrepancias observadas.

Partiendo de la idea de que es necesario cierto grado de actividad de GSK3 β para promover el crecimiento axonal (Kim et al., 2006), y apoyando los resultados presentados en este trabajo, en los que la actividad de GSK3 β tras la estimulación con moléculas inhibitorias se vería incrementada; podemos hipotetizar sobre que una disminución de la actividad de GSK3 β tras la estimulación podría conllevar el retorno de la actividad GSK3 β a un estado basal, promoviendo así el crecimiento axonal o la regeneración. De hecho, como hemos comentado, existen evidencias de que el tratamiento con elevadas concentraciones de los inhibidores selectivos sobre GSK3 β en CGNs

y DRGs cultivados sobre sustratos no inhibitorios reduce el crecimiento neurítico, confirmando el requerimiento de una actividad GSK3 basal, claramente necesaria para el crecimiento normal de las neuritas en desarrollo (Kim et al., 2006)

Sin embargo, cada uno de los trabajos, el de Alabed y el de Dill, obtiene un resultado opuesto al otro tras el tratamiento con los inhibidores de GSK3 β entonces, ¿cómo podemos explicar esas diferencias? Otro de los factores a tener en cuenta es el uso de diferentes concentraciones de mielina para la estimulación de los diferentes cultivos neuronales. En el caso de Alabed y colaboradores, la concentración de mielina en los ensayos de crecimiento neurítico es menor que en el caso de los ensayos realizados por Dill y colaboradores. Con respecto a los resultados de esta tesis, incluso la menor recuperación de la longitud neurítica obtenida por los ensayos de Dill y colaboradores podría ser debida a que en nuestro caso utilizamos la concentración efectiva máxima para el tratamiento con ambos inhibidores, el SB-415286 y el SB-216763 (Cross et al., 2001).

e. GSK3 β y las modificaciones transcripcionales

A parte de los efectos directos sobre los componentes estructurales neuronales, GSK3 β parece estar también implicada en los procesos de modificación transcripcional que afectaría a la organización del citoesqueleto. Estudios recientes han descrito como la señalización debida a la interacción entre Nogo66 y NgR1 regulan la expresión de diversos factores como Nanog (factor clave en el mantenimiento de la pluripotencia en las *embryonic stem cells* (ESCs) en ratón) a través de la activación de STAT3 (Gao et al., 2010b). STAT3 es regulada positivamente a través de la *mammalian target of rapamycin* (mTOR) y la señalización mTOR/STAT3 es a su vez negativamente regulada a través de PTEN en modelos celulares no neuronales (Zhou et al., 2007) (Figura 3). De hecho, la delección de PTEN en las neuronas ganglionares de la retina en estado maduro (RGCs) incrementa la regeneración axonal tras lesión debido a la acumulación de PIP₃ y la posterior activación de AKT que

podría dar lugar al boqueo de la actividad de GSK3 β (Figura 3). Además, se produciría el bloqueo de la vía mTOR/STAT3 (Figura 3). Entonces, una mayor activación de mTOR debida provocada por el bloqueo de PTEN promovería un incremento en la síntesis de componentes moleculares necesarios para la extensión axonal, de la misma forma que la actividad incrementada de GSK3 β que observaríamos tras la lesión, se vería mitigada por ese incremento en la fosforilación de AKT y la disminución de los niveles de actividad GSK3 β hasta alcanzar los niveles basales necesarios para el crecimiento axonal normal. GSK3 β , por lo tanto, facilitaría el transporte de los componentes moleculares

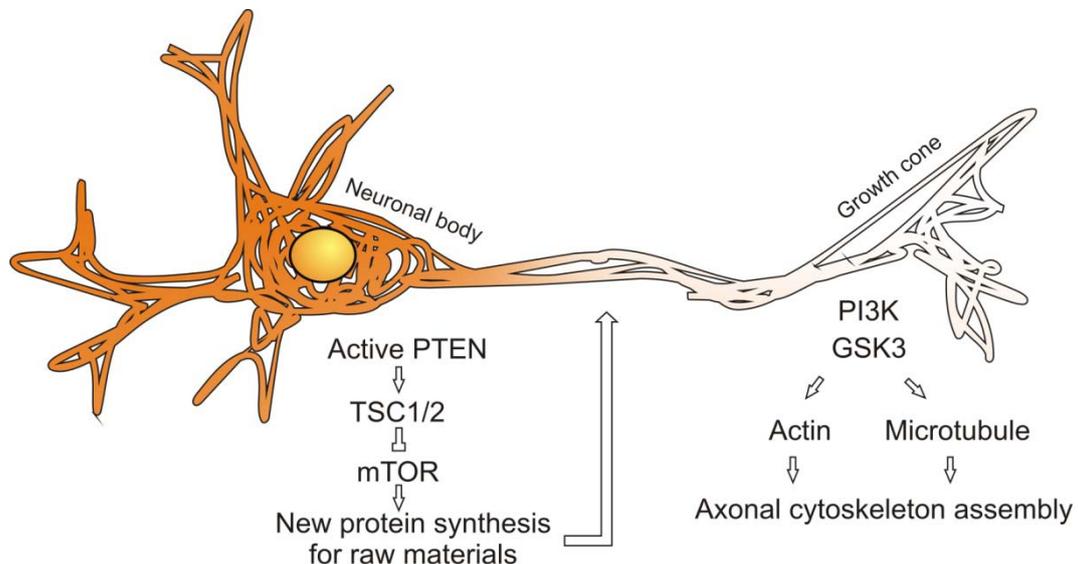


Figura 3. Posible mecanismo de acción de PTEN y mTOR en la inducción de regeneración axonal. Adaptado de Park et al. 2010.

sintetizados y finalmente tendría lugar su ensamblaje en el terminal axonal (Morita and Sobue, 2009, Polak and Hall, 2009). También, la inactivación o disminución de la hiperactividad de GSK3 β podría ser beneficiosa para la protección del tejido dañado, ya que se ha visto que promueve la proliferación de células madre endógenas (Lange et al., 2011) y su bloqueo con los inhibidores SB-415286 y SB-216763 en cultivos primarios de neuronas protege a los mismos de la muerte celular (Cross et al., 2001).

Estos estudios proporcionan evidencias claras del papel importantísimo de GSK3 β influenciando en el crecimiento axonal en relación con las proteínas clásicas involucradas en los procesos de modificación transcripcional, y podría ser de gran interés para futuros estudios el profundizar.

III. La vía de la p38 MAPK quinasa, una posible vía complementaria

La señalización a través del complejo NgR1 en neuronas que produce la limitación en la regeneración de los axones neuronales en el SNC, converge en el citoesqueleto para mediar tanto el colapso del cono de crecimiento como la inhibición del crecimiento neurítico. La Rho GTPasa y su efector *downstream*, la quinasa Rho son intermediarios clave en la respuesta a las MAIs; sin embargo, la unión entre Rho y el citoesqueleto de actina no está todavía muy bien definida.

Hsieh y colaboradores han descrito que Nogo66, el fragmento con mayor poder inhibitorio de Nogo-A, desencadena la señalización a través de la LIM quinasa y la fosfatasa *Slingshot* (SSH) para regular la fosforilación de la Cofilina, factor de despolimerización asociado a la actina (Hsieh et al., 2006). El bloqueo de la activación de LIMK1 y la consiguiente fosforilación de la Cofilina parecen evitar la inhibición del crecimiento neurítico dependiente de de mielina en las DRGs de pollo, sugiriendo que la regulación de la Cofilina es crítica para las respuestas neuronales inhibitorias (Hsieh et al., 2006). La posterior activación de la fosfatasa SSH1 media la defosforilación y reactivación de la Cofilina.

Nosotros hemos observado cómo tras 30 minutos de estímulo con mielina las Neuronas Granulares del Cerebelo en cultivo sufren una ligera defosforilación, indicando la mayor activación de la Cofilina y apoyando los resultados obtenidos por Hsieh y colaboradores. Además, hemos observado un incremento en la fosforilación de p38 MAPK. La p38 MAPK ya ha sido con anterioridad relacionada con los procesos de inhibición tras lesión, encontrándose un incremento de su actividad en la zona periférica del nervio ciático lesionado (Myers et al., 2003). Según Kobayashi y colaboradores la fosforilación de p38 MAPK sería crucial para la regulación de la dinámica de la actina a través de la fosforilación de la *MAPK-activated protein kinase-2* (MK2) que a su vez activaría la LIM quinasa, produciendo esta última la inhibición de la actividad Cofilina a través de su fosforilación (Kobayashi et al., 2006).

Nuestros resultados iniciales ayudarían a reforzar y explicar los resultados obtenidos por Hsieh y colaboradores otorgando un papel importante a la quinasa p38 MAPK. Así pues parecería ser que existiría una secuencialidad en la activación y función de la p38 MAPK; así mientras en un primer momento su actividad desencadenaría la fosforilación de LIM quinasa y fosforilación de Cofilina. Tras una estimulación más larga se produciría la activación de la SSH1 que conduciría a la defosforilación de la Cofilina y su reactivación. Esto le otorgaría un papel similar al ya propuesto para la quinasa ROCK (quinasa con un papel clave en los procesos de inhibición axonal frente a MAIs) sobre estas mismas quinasas (Hsieh et al., 2006). El mecanismo por el cual SSH1 estaría actuando todavía se desconoce. Además, un reciente trabajo de Tang y colaboradores realizado sobre neutrófilos enfrentados a moléculas quimioatrayentes abre el interrogante de si, tal y como ya describen para su modelo, GSK3 β podría producir una inhibición sobre SSH1 en neuronas. Y por tanto, en un estadio agudo tardío esta regulación sería en parte dependiente de la actividad de la p38 MAPK, dando finalmente lugar a una defosforilación (activación) de la Cofilina como parte de los mecanismo iniciales de inhibición axonal (Tang et al., 2011) (Figura 4).

Además, el pico de fosforilación de p38 MAPK que hemos observado encajaría perfectamente con la disminución de la actividad de la quinasa GSK3 β observada tras estimular con mielina durante 30 minutos. Ya que la fosforilación de extremo C terminal de GSK3 β por p38 MAPK produce su inhibición (Thornton et al., 2008) (Figura 4). Así pues, también apoyaría la idea de la existencia de una divergencia entre los procesos agudo y crónico, tal y como muestran nuestros resultados (Capítulo I y II), y como hemos discutido con anterioridad. En los que, por un lado, se produciría primero una afectación del citoesqueleto de actina a través de la activación de RhoA, defosforilación de Cofilina (en un estadio agudo algo más avanzado), y la promoción de la inactivación de GSK3 β , una de las principales quinasas implicadas en la modificación del citoesqueleto microtubular; y que adquiriría mucha mayor relevancia durante la inhibición crónica, en la que tras producirse el colapso del cono de crecimiento (principalmente formado por el citoesqueleto de actina) se

produciría la retracción del axón cuyo componente principal es el citoesqueleto microtubular (Figura 4).

A partir de estos indicios iniciales se deberían realizar estudios más extensos para realmente comprobar, tras estímulos crónicos con mielina u otras moléculas inhibitorias en cultivos neuronales, o tras axotomía en nuestro modelo de cultivo organotípico, el estado de activación/fosforilación de estas quinasas (p38MAPKA, SSH1, LIM quinasas...) y de la Cofilina, y así clarificar su papel en el proceso inhibitorio.

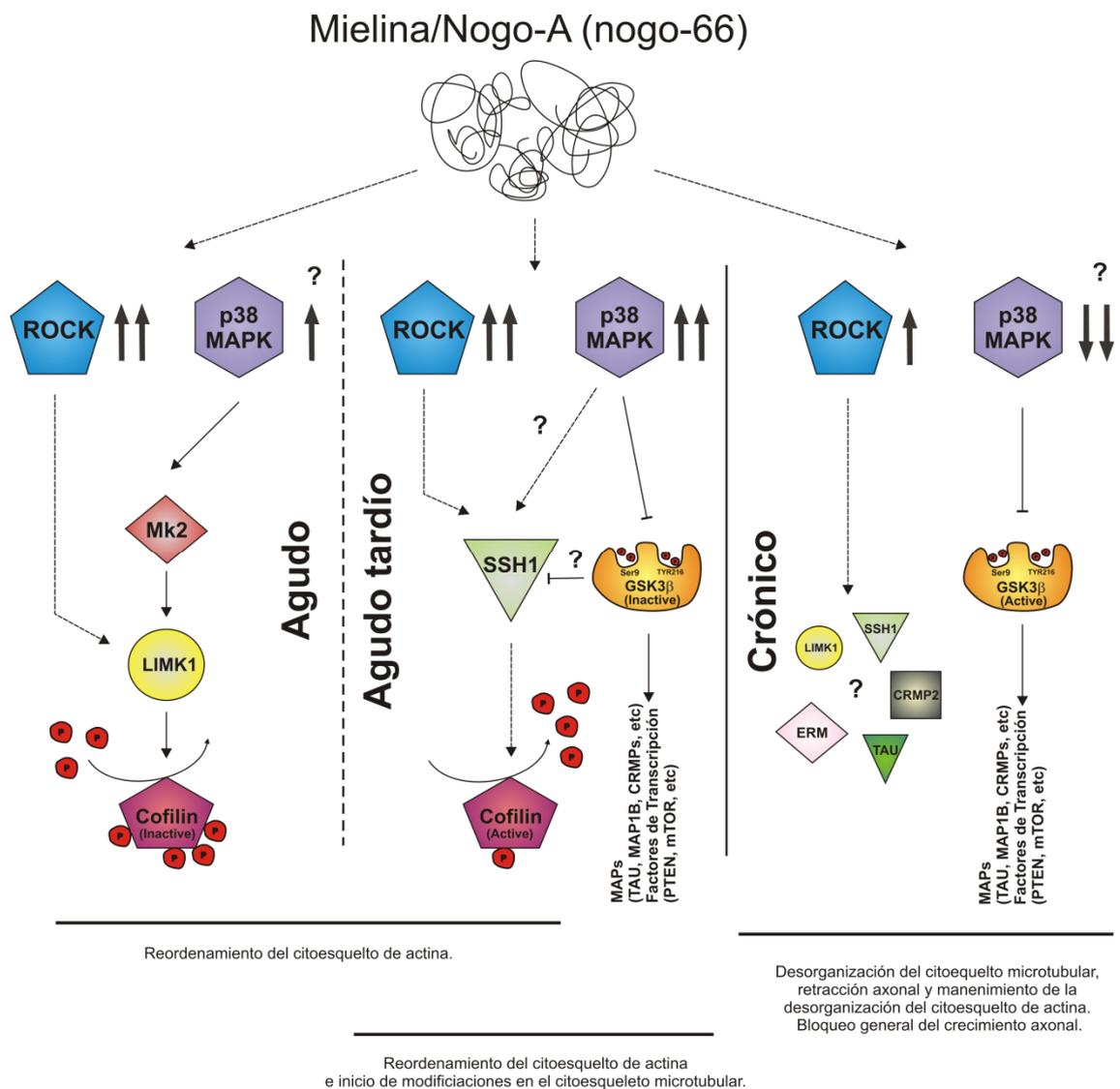


Figura 4. Esquema del posible mecanismo de acción secuencial de ROCK y p38 MAPK sobre el quinasas y el citoesqueleto neuronal. p38 MAPK actuaría de manera secuencial tras el estímulo con mielina, diferenciándose tres estadios: Agudo, Agudo tardío y Crónico. A pesar de no estar claro, en un primer estadio Agudo, p38 MAPK mantendría una baja actividad al contrario que la ROCK que se mantendría activa y que supliría la baja actividad de baja actividad p38 MAPK activando la LIMK1 y dando lugar a la fosforilación e inactivación de Cofilina. Como consecuencia, tendría lugar un reordenamiento inicial del citoesqueleto de actina. En un segundo estadio (o subestadio), el Agudo tardío; se produciría un incremento de la actividad p38MAPK y se mantendría la actividad ROCK. Aunque está claro que ROCK afectaría la quinasa SSH1, la cual a su vez induciría la activación por defosforilación de la Cofilina; no se ha determinado si p38 MAPK también afectaría a SSH1 (?). A su vez, una mayor actividad p38 MAPK produce la inhibición de GSK3 β , que al mismo tiempo no podría ejercer un posible efecto inhibitorio sobre la SSH1 tal y como se ha descrito para otros modelos celulares (Thornton et al., 2008); favoreciéndose así la reorganización microtubular del citoesqueleto de actina por encima del citoesqueleto microtubular. Por último, en el estadio Crónico, se produciría una disminución leve de la actividad ROCK, la cual continuaría contribuyendo al mantenimiento de la inestabilidad del citoesqueleto de actina; mientras, la p38 MAPK disminuiría de manera importante su actividad (?) contribuyendo así al incremento de la actividad de GSK3 β y por tanto a la reorganización microtubular, que a su vez dará lugar a la retracción y al bloqueo general del crecimiento axonal. Abreviaturas: SSH1, fosfatasa *Slingshot*; *ERM*, *ERM proteins* (*eZRin*, *radixin*, and *moesin*).

IV. ¿Podría OMgp estar ayudando a las neuronas a modular la transmisión sináptica?

La expresión de OMgp en el telencefalo aparece en estadios del desarrollo muy tempranos, previos incluso al inicio de la mielinización, siendo los tractos axonales los primeros en mostrar inmunoreactividad. En general, nuestros resultados refuerzan la idea de que OMgp se expresa en neuronas (Gil et al., 2010). La expresión de OMgp en estadios tan tempranos del desarrollo, anterior a la expresión de NgR1 y al inicio de la mielinización, sugiere que OMgp puede ejercer durante el desarrollo perinatal funciones diferentes a la formación de nodos de Ranvier y a la inhibición del crecimiento axonal tras lesión (Huang et al., 2005; Nie et al., 2006; Wang et al., 2002b). Si comparamos los niveles de expresión de los ligandos y receptores del complejo en el telencéfalo, podemos ver que algunos miembros del complejo muestran expresión temprana, como es el caso de Nogo-A, OMgp y Lingo-1 (Figura1, Capítulo III de Resultados).

Al igual que otros miembros de las MAIs o receptores/co-receptores, como es el caso del NgR1 (Fournier et al., 2002b, Schwab, 2002); la función de la proteína OMgp ha estado asociada desde hace años con la inhibición del

crecimiento axonal tras lesión en el SNC adulto (ej. ((Kottis et al., 2002, Wang et al., 2002b)). Sin embargo, nuevos trabajos desarrolladas en los últimos años indican que los ligandos de la mielina y sus receptores poseen roles diferentes, alejados con respecto a los que habían sido relacionados en un primer momento. Por ejemplo, Nogo-A juega un papel importante en la extensión neurítica, la migración neuronal tangencial (Mingorance-Le Meur et al., 2007) o la maduración de oligodendrocitos (Pernet et al., 2008) durante el desarrollo cortical. Además, recientemente se ha conocido la implicación de NgR1 en la modificación de la morfología de las espinas dendríticas y la fuerza sináptica dependiente de la actividad.

En un interesante estudio, Endo y colaboradores demostraron que NgR1 es sufre una reducción en su expresión en la corteza somatosensorial tras producirse una lesión en la médula espinal, sugiriendo así una implicación de la señalización mediada a través del Nogo Receptor 1 en la plasticidad cortical dependiente de la actividad (Endo et al., 2007).

En esta tesis demostramos que OMgp puede inducir el incremento de EPSPs en neuronas de hipocampo en cultivo y que esta actividad del tipo *bursting* parece estar mediada por NgR1. Además la aparición de la expresión de OMgp en interneuronas del hipocampo es coincidente en el tiempo con la aparición de los primeros potenciales inhibitorios en etapas postnatales, lo que podría implicar un posible papel de la proteína OMgp en la regulación de la actividad sináptica de esas células (Gil et al., 2010) .

Algunos trabajos han descrito que tanto Nogo-A como el receptor NgR1 se localizan a nivel de sinapsis. En nuestro trabajo hemos demostrado que, mediante el uso de técnicas bioquímicas y inmunocitoquímicas, OMgp se localiza en las fracciones sinaptosomales y en las estructuras *bouton-like* de las terminaciones sinápticas. A partir de estas observaciones llegamos a la conclusión de que realmente OMgp podría estar actuando a nivel sináptico. Nuestros estudios electrofisiológicos sugieren, además, que las acciones de OMgp a su vez estarían mediadas a través de NgR1 y que serían completamente abolidas en presencia del TTX. A pesar de ello, estudios más exhaustivos serían necesarios para confirmar de manera fiable que estas

acciones debidas a la estimulación de OMgp estarían realmente mediadas por el NgR1. Al respecto, un reciente estudio publicado por Lee y colaboradores (Lee et al., 2008), indica que NgR1 estaría modulando la transmisión sináptica a través de la regulación de la señalización de FGF2-FGFR. De esta manera, sería interesante estudiar si posibles interacciones OMgp-NgR1 podrían estar regulando el papel de FGF2 durante el desarrollo cortical así como en condiciones de normalidad como neurodegenerativas.

A pesar de la certeza de que OMgp, y algunos de los miembros de las MAIs estarían implicados en la regulación de la plasticidad sináptica existen ciertas discrepancias al respecto. Así pues, recientemente ha sido descrito como la estimulación aguda con OMgp de las sinapsis colaterales de Schaffer-CA1 en rodajas de hipocampo produciría una supresión o disminución de la LTP de manera NgR1-dependiente y parcialmente dependiente del receptor PirB (Raiker et al., 2010). También el registro de los EPSP evocados desencadenados por la estimulación de las proyecciones colaterales de Schaffer tras el estímulo local con OMgp no tendrían efecto alguno sobre estos en los rangos de estímulo utilizados para el estudio (Raiker et al., 2010) . De esta manera, el trabajo de Raiker y colaboradores estaría afirmando que, contrariamente a nuestros resultados obtenidos mediante el sistema E₂Dish, la aplicación aguda de OMgp no alteraría de manera significativa la transmisión sináptica basal. A pesar de ello, y en concordancia con nuestros resultados, parecen reafirmar que ciertamente el papel del receptor NgR1 sería clave en la modificación y regulación de la plasticidad sináptica.

Por otro lado, la realización de nuevos experimentos mediante la utilización del *Patch clamp* en neuronas del hipocampo, así como también la utilización de otros modelos neuronales reforzarían nuestros resultados. A pesar de las diferencias observadas entre los dos trabajos, ambos identifican a OMgp y NgR1 como reguladores de la plasticidad sináptica y claramente sugieren nuevos papeles para estas moléculas más allá de sus funciones sobre la inhibición del crecimiento neurítico y la regulación de la morfología neuronal.

CONCLUSIONES

1. La activación diferencial de las quinasas ERK1/2 y GSK3 β frente a diferentes tipos de estímulo con mielina (Agudo y Crónico) demuestra la existencia de diferentes fases tras daño neuronal.
2. Contrariamente a los resultados obtenidos con el bloqueo de GSK3 β , el bloqueo con inhibidores de la actividad ERK1/2 no produce un incremento del crecimiento neurítico de las Neuronas Granulares del Cerebelo (CGNs) cultivadas sobre mielina.
3. p38 MAPK podría estar actuando de forma secuencial tras el estímulo con mielina en CGNs corroborando así la existencia de marcados estadios tras lesión en el SNC (Agudo, Agudo tardío y Crónico). Además esta actividad estaría, indirectamente, alterando el estado de actividad de la Cofilina, dando a su vez lugar a un reordenamiento del citoesqueleto de actina.
4. GSK3 β se activa en cultivos axotomizados de la vía Entorrino-Hipocámpica (EH) provenientes de animales *NgR1*^{-/-}.
5. El uso de inhibidores de GSK3 β produce una mejora en la extensión neurítica de CGNs y en la regeneración axonal tras axotomía de la vía Entorrino-Hipocámpica (EH) en cultivos organotípicos obtenidos tanto de animales *NgR1*^{+/+} como *NgR1*^{-/-}.
6. La activación y la posterior regeneración axonal inducida tras la inhibición de GSK3 β en cultivos organotípicos *NgR1*^{-/-} de la vía Entorrino-Hipocámpica (EH) axotomizados, implica la participación de otros receptores, a parte del NgR1, en su activación.
7. Tomados en conjunto nuestros datos indican que el tratamiento inhibitorio de GSK3 β puede ser considerado como una posible diana para la mejora de la regeneración de los axones corticales tras lesión.

8. OMgp se localiza en terminales presinápticos, tanto en desarrollo como en el adulto.
9. Los resultados obtenidos mediante la tecnología E²dish[®] sugieren la participación de OMgp en la actividad sináptica.

BIBLIOGRAFÍA

- Adalbert R, Gillingwater TH, Haley JE, Bridge K, Beirowski B, Berek L, Wagner D, Grumme D, Thomson D, Celik A, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP (A rat model of slow Wallerian degeneration (WldS) with improved preservation of neuromuscular synapses. *Eur J Neurosci* 21:271-277.2005).
- Adams DJ, Gage PW (Ionic currents in response to membrane depolarization in an *Aplysia* neurone. *J Physiol* 289:115-141.1979).
- Adams JP, Sweatt JD (Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:135-163.2002).
- Aguayo AJ, David S, Bray GM (Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 95:231-240.1981).
- Ahmad FJ, Yu W, McNally FJ, Baas PW (An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *J Cell Biol* 145:305-315.1999).
- Ahmed A, Eickholt BJ (Intracellular kinases in semaphorin signaling. *Adv Exp Med Biol* 600:24-37.2007).
- Alabed YZ, Pool M, Ong Tone S, Fournier AE (Identification of CRMP4 as a convergent regulator of axon outgrowth inhibition. *J Neurosci* 27:1702-1711.2007).
- Alabed YZ, Pool M, Ong Tone S, Sutherland C, Fournier AE (GSK3 beta regulates myelin-dependent axon outgrowth inhibition through CRMP4. *J Neurosci* 30:5635-5643.2010).
- Ali A, Hoefflich KP, Woodgett JR (Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev* 101:2527-2540.2001).
- Aloy EM, Weinmann O, Pot C, Kasper H, Dodd DA, Rulicke T, Rossi F, Schwab ME (Synaptic destabilization by neuronal Nogo-A. *Brain Cell Biol* 35:137-156.2006).
- Arimura N, Hattori A, Kimura T, Nakamuta S, Funahashi Y, Hirotsumi S, Furuta K, Urano T, Toyoshima YY, Kaibuchi K (CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity. *J Neurochem* 111:380-390.2009).
- Arimura N, Inagaki N, Chihara K, Menager C, Nakamura N, Amano M, Iwamatsu A, Goshima Y, Kaibuchi K (Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem* 275:23973-23980.2000).
- Arimura N, Menager C, Kawano Y, Yoshimura T, Kawabata S, Hattori A, Fukata Y, Amano M, Goshima Y, Inagaki M, Morone N, Usukura J, Kaibuchi K (Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Mol Cell Biol* 25:9973-9984.2005).
- Ashley JF, Cramer NB, Davis RH, Bowman CN (Soft-lithography fabrication of microfluidic features using thiol-ene formulations. *Lab Chip* 11:2772-2778.2011).
- Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M (PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science* 322:967-970.2008).
- Baas PW, Buster DW (Slow axonal transport and the genesis of neuronal morphology. *J Neurobiol* 58:3-17.2004).
- Bagri A, Cheng HJ, Yaron A, Pleasure SJ, Tessier-Lavigne M (Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell* 113:285-299.2003).
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408:297-315.2007).
- Bandtlow CE, Schwab ME (NI-35/250/nogo-a: a neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. *Glia* 29:175-181.2000).

- Barnabe-Heider F, Goritz C, Sabelstrom H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K, Frisen J (Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 7:470-482.2010).
- Barres BA, Schmid R, Sendtner M, Raff MC (Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118:283-295.1993).
- Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, McMahon SB, Bradbury EJ (Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci* 26:10856-10867.2006).
- Barton WA, Liu BP, Tzvetkova D, Jeffrey PD, Fournier AE, Sah D, Cate R, Strittmatter SM, Nikolov DB (Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *Embo J* 22:3291-3302.2003).
- Bartsch U, Bandtlow CE, Schnell L, Bartsch S, Spillmann AA, Rubin BP, Hillenbrand R, Montag D, Schwab ME, Schachner M (Lack of evidence that myelin-associated glycoprotein is a major inhibitor of axonal regeneration in the CNS. *Neuron* 15:1375-1381.1995).
- Ben-Yakar A, Chronis N, Lu H (Microfluidics for the analysis of behavior, nerve regeneration, and neural cell biology in *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol* 19:561-567.2009).
- Benson MD, Romero MI, Lush ME, Lu QR, Henkemeyer M, Parada LF (Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10694-10699.2005).
- Berdichevsky Y, Sabolek H, Levine JB, Staley KJ, Yarmush ML (Microfluidics and multielectrode array-compatible organotypic slice culture method. *J Neurosci Methods* 178:59-64.2009).
- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J (Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89:1313-1317.2004).
- Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM (Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11074-11079.2000).
- Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, Shannon CP, Plemel JR, Xie Y, Miller FD, Tetzlaff W (Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci* 27:9545-9559.2007).
- Billingsley ML, Kincaid RL (Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* 323 (Pt 3):577-591.1997).
- Blake AJ, Rodgers FC, Bassuener A, Hippensteel JA, Pearce TM, Pearce TR, Zarnowska ED, Pearce RA, Williams JC (A microfluidic brain slice perfusion chamber for multisite recording using penetrating electrodes. *J Neurosci Methods* 189:5-13.2010).
- Bloom GS, Luca FC, Vallee RB (Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5404-5408.1985).
- Boato F, Hendrix S, Huelsenbeck SC, Hofmann F, Grosse G, Djalali S, Klimaschewski L, Auer M, Just I, Ahnert-Hilger G, Holtje M (C3 peptide enhances recovery from spinal cord injury by improved regenerative growth of descending fiber tracts. *J Cell Sci* 123:1652-1662.2010).
- Book AA, Fischer I, Yu XJ, Iannuzzelli P, Murphy EH (Altered expression of microtubule-associated proteins in cat trochlear motoneurons after peripheral and central lesions of the trochlear nerve. *Exp Neurol* 138:214-226.1996).
- Boulanger LM (Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 64:93-109.2009).
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (ERKs: a family of protein-

- serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-675.1991).
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249:64-67.1990).
- Bovolenta P, Feraud-Espinosa I (Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Progress in neurobiology* 61:113-132.2000).
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416:636-640.2002).
- Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G (Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 34:183-188.1990).
- Bretzner F, Plemel JR, Liu J, Richter M, Roskams AJ, Tetzlaff W (Combination of olfactory ensheathing cells with local versus systemic cAMP treatment after a cervical rubrospinal tract injury. *J Neurosci Res* 88:2833-2846.2010).
- Brock A, Chang E, Ho CC, LeDuc P, Jiang X, Whitesides GM, Ingber DE (Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir* 19:1611-1617.2003).
- Brosamle C, Huber AB, Fiedler M, Skerra A, Schwab ME (Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J Neurosci* 20:8061-8068.2000).
- Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T (Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96:795-806.1999).
- Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS, Kromer LF (Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J Neurosci* 23:7789-7800.2003).
- Burgaya F, Fontana X, Martinez A, Montolio M, Mingorance A, Simo S, del Rio JA, Soriano E (Semaphorin 6C leads to GSK-3-dependent growth cone collapse and redistributes after entorhino-hippocampal axotomy. *Mol Cell Neurosci* 33:321-334.2006).
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostendorf T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297-308.1999).
- Buss A, Pech K, Merkler D, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, Schwab ME, Brook GA (Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain* 128:356-364.2005).
- Buss A, Schwab ME (Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the rat spinal cord. *Glia* 42:424-432.2003).
- Caceres A, Kosik KS (Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343:461-463.1990).
- Caceres A, Mautino J, Kosik KS (Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9:607-618.1992).
- Cadelli D, Schwab ME (Regeneration of Lesioned Septohippocampal Acetylcholinesterase-positive Axons is Improved by Antibodies Against the Myelin-associated Neurite Growth Inhibitors NI-35/250. *Eur J Neurosci* 3:825-832.1991).
- Cafferty WB, Kim JE, Lee JK, Strittmatter SM (Response to correspondence: Kim et al., "axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B." *Neuron* 38, 187-199. *Neuron* 54:195-199.2007a).
- Cafferty WB, Yang SH, Duffy PJ, Li S, Strittmatter SM (Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci* 27:2176-2185.2007b).

- Cai D, Deng K, Mellado W, Lee J, Ratan RR, Filbin MT (Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth MAG and myelin in vitro. *Neuron* 35:711-719.2002).
- Cai D, Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT (Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci* 21:4731-4739.2001).
- Carim-Todd L, Escarceller M, Estivill X, Sumoy L (LRRN6A/LERN1 (leucine-rich repeat neuronal protein 1), a novel gene with enriched expression in limbic system and neocortex. *The European journal of neuroscience* 18:3167-3182.2003).
- Caroni P, Schwab ME (Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1:85-96.1988a).
- Caroni P, Schwab ME (Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 106:1281-1288.1988b).
- Carulli D, Laabs T, Geller HM, Fawcett JW (Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 15:116-120.2005).
- Claverol-Tinture E, Cabestany J, Rosell X (Multisite recording of extracellular potentials produced by microchannel-confined neurons in-vitro. *IEEE Trans Biomed Eng* 54:331-335.2007).
- Claverol-Tinture E, Ghirardi M, Fiumara F, Rosell X, Cabestany J (Multielectrode arrays with elastomeric microstructured overlays for extracellular recordings from patterned neurons. *J Neural Eng* 2:L1-7.2005).
- Claverol-Tinture E, Pine J (Extracellular potentials in low-density dissociated neuronal cultures. *J Neurosci Methods* 117:13-21.2002).
- Clay JR (Potassium current in the squid giant axon. *Int Rev Neurobiol* 27:363-384.1985).
- Codeluppi S, Svensson CI, Hefferan MP, Valencia F, Silldorff MD, Oshiro M, Marsala M, Pasquale EB (The Rheb-mTOR pathway is upregulated in reactive astrocytes of the injured spinal cord. *J Neurosci* 29:1093-1104.2009).
- Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter PS, Roxbee Cox L, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, Holder JC (Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* 7:793-803.2000).
- Cohen E, Ivenshitz M, Amor-Baroukh V, Greenberger V, Segal M (Determinants of spontaneous activity in networks of cultured hippocampus. *Brain Res* 1235:21-30.2008).
- Cole AR, Causeret F, Yadirgi G, Hastie CJ, McLauchlan H, McManus EJ, Hernandez F, Eickholt BJ, Nikolic M, Sutherland C (Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *J Biol Chem* 281:16591-16598.2006).
- Cole AR, Noble W, van Aalten L, Plattner F, Meimaridou R, Hogan D, Taylor M, LaFrancois J, Gunn-Moore F, Verkhatsky A, Oddo S, LaFerla F, Giese KP, Dineley KT, Duff K, Richardson JC, Yan SD, Hanger DP, Allan SM, Sutherland C (Collapsin response mediator protein-2 hyperphosphorylation is an early event in Alzheimer's disease progression. *J Neurochem* 103:1132-1144.2007).
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.1995).
- Cross DA, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD (Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J Neurochem* 77:94-102.2001).

- Cuchillo-Ibanez I, Seereeram A, Byers HL, Leung KY, Ward MA, Anderton BH, Hanger DP (Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *FASEB J* 22:3186-3195.2008).
- Chen CS, Alonso JL, Ostuni E, Whitesides GM, Ingber DE (Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 307:355-361.2003).
- Chen DF, Schneider GE, Martinou JC, Tonegawa S (Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature* 385:434-439.1997).
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403:434-439.2000).
- Chen W, Lam RH, Fu J (Photolithographic surface micromachining of polydimethylsiloxane (PDMS). *Lab Chip* 12:391-395.2012).
- Chen Y, Aulia S, Tang BL (Myelin-associated glycoprotein-mediated signaling in central nervous system pathophysiology. *Mol Neurobiol* 34:81-91.2006).
- Chen Y, Zeng J, Cen L, Chen Y, Wang X, Yao G, Wang W, Qi W, Kong K (Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. *The Journal of international medical research* 37:281-288.2009).
- Chivatakarn O, Kaneko S, He Z, Tessier-Lavigne M, Giger RJ (The Nogo-66 receptor NgR1 is required only for the acute growth cone-collapsing but not the chronic growth-inhibitory actions of myelin inhibitors. *J Neurosci* 27:7117-7124.2007).
- Chung IY, Benveniste EN (Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol* 144:2999-3007.1990).
- Dashiell SM, Tanner SL, Pant HC, Quarles RH (Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases. *J Neurochem* 81:1263-1272.2002).
- de Wit J, Verhaagen J (Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog Neurobiol* 71:249-267.2003).
- DeBellard ME, Tang S, Mukhopadhyay G, Shen YJ, Filbin MT (Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Mol Cell Neurosci* 7:89-101.1996).
- Dehmelt L, Halpain S (The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6:204.2005).
- Del Rio JA, Heimrich B, Borrell V, Forster E, Drakew A, Alcantara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, Soriano E (A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385:70-74.1997).
- del Rio JA, Sole M, Borrell V, Martinez A, Soriano E (Involvement of Cajal-Retzius cells in robust and layer-specific regeneration of the entorhino-hippocampal pathways. *Eur J Neurosci* 15:1881-1890.2002).
- del Rio JA, Soriano E (Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration. *Nat Protoc* 5:217-226.2010).
- Delekate A, Zagrebelsky M, Kramer S, Schwab ME, Korte M (NogoA restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:2569-2574.2011).
- Dent EW, Gertler FB (Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.2003).
- Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK (Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5:118-125.2003).
- Dickson HM, Zurawski J, Zhang H, Turner DL, Vojtek AB (POSH is an intracellular signal transducer for the axon outgrowth inhibitor Nogo66. *J Neurosci* 30:13319-13325.2010).

- Dieterich DC, Trivedi N, Engelmann R, Gundelfinger ED, Gordon-Weeks PR, Kreutz MR (Partial regeneration and long-term survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush is accompanied by altered expression, phosphorylation and distribution of cytoskeletal proteins. *Eur J Neurosci* 15:1433-1443.2002).
- Dill J, Wang H, Zhou F, Li S (Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS. *J Neurosci* 28:8914-8928.2008).
- Dimou L, Schnell L, Montani L, Duncan C, Simonen M, Schneider R, Liebscher T, Gullo M, Schwab ME (Nogo-A-deficient mice reveal strain-dependent differences in axonal regeneration. *J Neurosci* 26:5591-5603.2006).
- DiTella MC, Feiguin F, Carri N, Kosik KS, Caceres A (MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci* 109 (Pt 2):467-477.1996).
- Dodd DA, Niederoest B, Bloechlinger S, Dupuis L, Loeffler JP, Schwab ME (Nogo-A, -B, and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *J Biol Chem* 280:12494-12502.2005).
- Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin M (Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 35:283-290.2002).
- Duan Y, Giger RJ (A new role for RPTPsigma in spinal cord injury: signaling chondroitin sulfate proteoglycan inhibition. *Sci Signal* 3:pe6.2010).
- Eby MT, Jasmin A, Kumar A, Sharma K, Chaudhary PM (TAJ, a novel member of the tumor necrosis factor receptor family, activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and mediates caspase-independent cell death. *The Journal of biological chemistry* 275:15336-15342.2000).
- Emery DL, Raghupathi R, Saatman KE, Fischer I, Grady MS, McIntosh TK (Bilateral growth-related protein expression suggests a transient increase in regenerative potential following brain trauma. *J Comp Neurol* 424:521-531.2000).
- Endo T, Spenger C, Tominaga T, Brene S, Olson L (Cortical sensory map rearrangement after spinal cord injury: fMRI responses linked to Nogo signalling. *Brain* 130:2951-2961.2007).
- Eng LF, Reier PJ, Houle JD (Astrocyte activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Prog Brain Res* 71:439-455.1987).
- Engesser-Cesar C, Ichiyama RM, Nefas AL, Hill MA, Edgerton VR, Cotman CW, Anderson AJ (Wheel running following spinal cord injury improves locomotor recovery and stimulates serotonergic fiber growth. *Eur J Neurosci* 25:1931-1939.2007).
- English JD, Sweatt JD (Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 271:24329-24332.1996).
- Errico A, Claudiani P, D'Addio M, Rugarli EI (Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon. *Hum Mol Genet* 13:2121-2132.2004).
- Erschbamer M, Pernold K, Olson L (Inhibiting epidermal growth factor receptor improves structural, locomotor, sensory, and bladder recovery from experimental spinal cord injury. *J Neurosci* 27:6428-6435.2007).
- Faden AI, Jacobs TP, Mougey E, Holaday JW (Endorphins in experimental spinal injury: therapeutic effect of naloxone. *Ann Neurol* 10:326-332.1981).
- Fang JY, Richardson BC (The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6:322-327.2005).
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143-2155.2004).
- Fawcett JW, Asher RA (The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49:377-391.1999).

- Feinstein DL (Potentiation of astroglial nitric oxide synthase type-2 expression by lithium chloride. *J Neurochem* 71:883-886.1998).
- Fernandez-Valle C, Bunge RP, Bunge MB (Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 24:667-679.1995).
- Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribe E, Dalfo E, Avila J (Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2:3-18.2005).
- Fiedler M, Horn C, Bandtlow C, Schwab ME, Skerra A (An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity. *Protein Eng* 15:931-941.2002).
- Filbin MT (Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 4:703-713.2003).
- Finger JH, Bronson RT, Harris B, Johnson K, Przyborski SA, Ackerman SL (The netrin 1 receptors Unc5h3 and Dcc are necessary at multiple choice points for the guidance of corticospinal tract axons. *J Neurosci* 22:10346-10356.2002).
- Fischer D, He Z, Benowitz LI (Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci* 24:1646-1651.2004).
- Fisher D, Xing B, Dill J, Li H, Hoang HH, Zhao Z, Yang XL, Bachoo R, Cannon S, Longo FM, Sheng M, Silver J, Li S (Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors. *J Neurosci* 31:14051-14066.2011).
- Fitch MT, Silver J (CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* 209:294-301.2008).
- Fournier AE, Gould GC, Liu BP, Strittmatter SM (Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci* 22:8876-8883.2002a).
- Fournier AE, GrandPre T, Gould G, Wang X, Strittmatter SM (Nogo and the Nogo-66 receptor. *Prog Brain Res* 137:361-369.2002b).
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409:341-346.2001).
- Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM (Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci* 23:1416-1423.2003).
- Freund P, Schmidlin E, Wannier T, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM (Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nat Med* 12:790-792.2006).
- Frolov MV, Huen DS, Stevaux O, Dimova D, Balczarek-Strang K, Elsdon M, Dyson NJ (Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev* 15:2146-2160.2001).
- Fukada M, Watakabe I, Yuasa-Kawada J, Kawachi H, Kuroiwa A, Matsuda Y, Noda M (Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J Biol Chem* 275:37957-37965.2000).
- Funahashi S, Hasegawa T, Nagano A, Sato K (Differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo receptors and their ligands in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 506:141-160.2008).
- Furuzono T, Kishida A, Yanagi M, Matsumoto T, Kanda T, Nakamura T, Aiko T, Maruyama I, Akashi M (Novel functional polymers: poly(dimethylsiloxane)-polyamide multiblock copolymer. V. The interaction between biomolecules and the surface of aramid-silicone resins. *J Biomater Sci Polym Ed* 7:871-880.1996).
- Furuzono T, Yashima E, Kishida A, Maruyama I, Matsumoto T, Akashi M (A novel biomaterial: poly(dimethylsiloxane)-polyamide multiblock copolymer I. Synthesis and evaluation of blood compatibility. *J Biomater Sci Polym Ed* 5:89-98.1993).

- Gao Y, Deng K, Cao Z, Graziani EI, Gilbert AM, Koehn FE, Wood A, Doherty P, Walsh FS (Amphotericin B, identified from a natural product screen, antagonizes CNS inhibitors to promote axon growth via activation of an Akt pathway in neurons. *J Neurochem* 113:1331-1342.2010a).
- Gao Y, Deng K, Hou J, Bryson JB, Barco A, Nikulina E, Spencer T, Mellado W, Kandel ER, Filbin MT (Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration in vivo. *Neuron* 44:609-621.2004).
- Gao Y, Nikulina E, Mellado W, Filbin MT (Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. *J Neurosci* 23:11770-11777.2003).
- Gao Y, Wang B, Xiao Z, Chen B, Han J, Wang X, Zhang J, Gao S, Zhao Y, Dai J (Nogo-66 regulates nanog expression through stat3 pathway in murine embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 19:53-60.2010b).
- Garcia-Alias G, Barkhuysen S, Buckle M, Fawcett JW (Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci* 12:1145-1151.2009).
- Garcia T, Jay D ([Phosphorylation of tau and Alzheimer's disease]. *Gac Med Mex* 140:329-333.2004).
- Garg SK, Banerjee R, Kipnis J (Neuroprotective immunity: T cell-derived glutamate endows astrocytes with a neuroprotective phenotype. *J Immunol* 180:3866-3873.2008).
- Garg SK, Kipnis J, Banerjee R (IFN-gamma and IL-4 differentially shape metabolic responses and neuroprotective phenotype of astrocytes. *J Neurochem* 108:1155-1166.2009).
- Garrido JJ, Simon D, Varea O, Wandosell F (GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett* 581:1579-1586.2007).
- George R, Griffin JW (Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Exp Neurol* 129:225-236.1994).
- Ghiani CA, Ying Z, de Vellis J, Gomez-Pinilla F (Exercise decreases myelin-associated glycoprotein expression in the spinal cord and positively modulates neuronal growth. *Glia* 55:966-975.2007).
- Giger RJ, Hollis ER, 2nd, Tuszynski MH (Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001867.2010).
- Giger RJ, Venkatesh K, Chivatakarn O, Raiker SJ, Robak L, Hofer T, Lee H, Rader C (Mechanisms of CNS myelin inhibition: evidence for distinct and neuronal cell type specific receptor systems. *Restor Neurol Neurosci* 26:97-115.2008).
- Gil V, Bichler Z, Lee JK, Seira O, Llorens F, Bribian A, Morales R, Claverol-Tinture E, Soriano E, Sumoy L, Zheng B, Del Rio JA (Developmental expression of the oligodendrocyte myelin glycoprotein in the mouse telencephalon. *Cereb Cortex* 20:1769-1779.2010).
- Gluckman PD, Guan J, Williams C, Scheepens A, Zhang R, Bennet L, Gunn A (Asphyxial brain injury--the role of the IGF system. *Mol Cell Endocrinol* 140:95-99.1998).
- Goddard CA, Butts DA, Shatz CJ (Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6828-6833.2007).
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-526.1989).
- Goldberg JL, Vargas ME, Wang JT, Mandemakers W, Oster SF, Sretavan DW, Barres BA (An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells. *J Neurosci* 24:4989-4999.2004).

- Golding JD, Rigley MacDonald ST, Juurlink BH, Rosser BW (The effect of glutamine on locomotor performance and skeletal muscle myosins following spinal cord injury in rats. *J Appl Physiol* 101:1045-1052.2006).
- Goldman DE (Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. *J Gen Physiol* 27:37-60.1943).
- Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR (Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol* 88:2187-2195.2002).
- Gonzalez-Billault C, Avila J, Caceres A (Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol Biol Cell* 12:2087-2098.2001).
- Goold RG, Gordon-Weeks PR (Glycogen synthase kinase 3beta and the regulation of axon growth. *Biochem Soc Trans* 32:809-811.2004).
- Goold RG, Gordon-Weeks PR (The MAP kinase pathway is upstream of the activation of GSK3beta that enables it to phosphorylate MAP1B and contributes to the stimulation of axon growth. *Mol Cell Neurosci* 28:524-534.2005).
- Goold RG, Owen R, Gordon-Weeks PR (Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci* 112 (Pt 19):3373-3384.1999).
- Gopalakrishnan SM, Teusch N, Imhof C, Bakker MH, Schurdak M, Burns DJ, Warrior U (Role of Rho kinase pathway in chondroitin sulfate proteoglycan-mediated inhibition of neurite outgrowth in PC12 cells. *J Neurosci Res* 86:2214-2226.2008).
- Goritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisen J (A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* 333:238-242.2011).
- Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM (Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 376:509-514.1995).
- Gou X, Wang Q, Yang Q, Xu L, Xiong L (TAT-NEP1-40 as a novel therapeutic candidate for axonal regeneration and functional recovery after stroke. *J Drug Target* 19:86-95.2011).
- Goux WJ (The conformations of filamentous and soluble tau associated with Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 41:13798-13806.2002).
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19:1-49.2005).
- Grados-Munro EM, Fournier AE (Myelin-associated inhibitors of axon regeneration. *J Neurosci Res* 74:479-485.2003).
- GrandPre T, Li S, Strittmatter SM (Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 417:547-551.2002).
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM (Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403:439-444.2000).
- Grenningloh G, Soehrman S, Bondallaz P, Ruchti E, Cadas H (Role of the microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth. *J Neurobiol* 58:60-69.2004).
- Grewal SS, York RD, Stork PJ (Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9:544-553.1999).
- Gris D, Marsh DR, Oatway MA, Chen Y, Hamilton EF, Dekaban GA, Weaver LC (Transient blockade of the CD11d/CD18 integrin reduces secondary damage after spinal cord injury, improving sensory, autonomic, and motor function. *J Neurosci* 24:4043-4051.2004).
- Grunewald E, Kinnell HL, Porteous DJ, Thomson PA (GPR50 interacts with neuronal NOGO-A and affects neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*.2009).
- Gruss HJ, Dower SK (The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines and molecular therapy* 1:75-105.1995).

- Gu Y, Ihara Y (Evidence that collapsin response mediator protein-2 is involved in the dynamics of microtubules. *J Biol Chem* 275:17917-17920.2000).
- Gulyas AI, Miles R, Sik A, Toth K, Tamamaki N, Freund TF (Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature* 366:683-687.1993).
- Guth L, Barrett CP, Donati EJ, Anderson FD, Smith MV, Lifson M (Essentiality of a specific cellular terrain for growth of axons into a spinal cord lesion. *Exp Neurol* 88:1-12.1985).
- Habib AA, Gulcher JR, Hognason T, Zheng L, Stefansson K (The OMgp gene, a second growth suppressor within the NF1 gene. *Oncogene* 16:1525-1531.1998a).
- Habib AA, Marton LS, Allwardt B, Gulcher JR, Mikol DD, Hognason T, Chattopadhyay N, Stefansson K (Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system. *Journal of neurochemistry* 70:1704-1711.1998b).
- Haeberle S, Zengerle R (Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip* 7:1094-1110.2007).
- Hagino S, Iseki K, Mori T, Zhang Y, Hikake T, Yokoya S, Takeuchi M, Hasimoto H, Kikuchi S, Wanaka A (Slit and glypican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. *Glia* 42:130-138.2003).
- Hains BC, Saab CY, Lo AC, Waxman SG (Sodium channel blockade with phenytoin protects spinal cord axons, enhances axonal conduction, and improves functional motor recovery after contusion SCI. *Exp Neurol* 188:365-377.2004).
- Halpain S, Dehmelt L (The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7:224.2006).
- Hall ED, Braughler JM (Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. *Surg Neurol* 18:320-327.1982).
- Hammarback JA, Obar RA, Hughes SM, Vallee RB (MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N-terminal microtubule-binding domain. *Neuron* 7:129-139.1991).
- Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N (Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369:488-491.1994).
- Hayami K, Fukuta D, Nishikawa Y, Yamashita Y, Inui M, Ohyama Y, Hikida M, Ohmori H, Takai T (Molecular cloning of a novel murine cell-surface glycoprotein homologous to killer cell inhibitory receptors. *J Biol Chem* 272:7320-7327.1997).
- He Z, Koprivica V (The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annu Rev Neurosci* 27:341-368.2004).
- Hebert SS, Papadopoulou AS, Smith P, Galas MC, Planel E, Silaharoglu AN, Sergeant N, Buee L, De Strooper B (Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19:3959-3969.2010).
- Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH (The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4:61-85.1990).
- Hirbec H, Gaviria M, Vignon J (Gacyclidine: a new neuroprotective agent acting at the N-methyl-D-aspartate receptor. *CNS Drug Rev* 7:172-198.2001).
- Hisaoka T, Morikawa Y, Kitamura T, Senba E (Expression of a member of tumor necrosis factor receptor superfamily, TROY, in the developing mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 143:105-109.2003).
- Hodgkin AL, Katz B (The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol* 108:37-77.1949).
- Holt GR, Koch C (Electrical interactions via the extracellular potential near cell bodies. *J Comput Neurosci* 6:169-184.1999).

- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E (A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97:927-941.1999).
- Horner PJ, Gage FH (Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407:963-970.2000).
- Hou ST, Jiang SX, Smith RA (Permissive and repulsive cues and signalling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *Int Rev Cell Mol Biol* 267:125-181.2008).
- Hsieh SH, Ferraro GB, Fournier AE (Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. *J Neurosci* 26:1006-1015.2006).
- Hu F, Strittmatter SM (The N-terminal domain of Nogo-A inhibits cell adhesion and axonal outgrowth by an integrin-specific mechanism. *J Neurosci* 28:1262-1269.2008).
- Huang JK, Phillips GR, Roth AD, Pedraza L, Shan W, Belkaid W, Mi S, Fex-Svenningsen A, Florens L, Yates JR, 3rd, Colman DR (Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth. *Science* 310:1813-1817.2005).
- Huang X, Wu DY, Chen G, Manji H, Chen DF (Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:347-354.2003).
- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF (Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci* 26:509-563.2003).
- Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, Oertle T, Schwab ME (Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci* 22:3553-3567.2002).
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR (Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 12:803-808.1993).
- Hunt D, Coffin RS, Anderson PN (The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review. *J Neurocytol* 31:93-120.2002a).
- Hunt D, Mason MR, Campbell G, Coffin R, Anderson PN (Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons. *Mol Cell Neurosci* 20:537-552.2002b).
- Hur EM, Saijilafu, Lee BD, Kim SJ, Xu WL, Zhou FQ (GSK3 controls axon growth via CLASP-mediated regulation of growth cone microtubules. *Genes Dev* 25:1968-1981.2011).
- Hur EM, Zhou FQ (GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 11:539-551.2010).
- Hyun JK, Kim HW (Clinical and experimental advances in regeneration of spinal cord injury. *J Tissue Eng* 2010:650857.2010).
- Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Menager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K (CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4:781-782.2001).
- Inatome R, Tsujimura T, Hitomi T, Mitsui N, Hermann P, Kuroda S, Yamamura H, Yanagi S (Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain. *J Biol Chem* 275:27291-27302.2000).
- Jain A, Brady-Kalnay SM, Bellamkonda RV (Modulation of Rho GTPase activity alleviates chondroitin sulfate proteoglycan-dependent inhibition of neurite extension. *J Neurosci Res* 77:299-307.2004).
- Ji B, Case LC, Liu K, Shao Z, Lee X, Yang Z, Wang J, Tian T, Shulga-Morskaya S, Scott M, He Z, Relton JK, Mi S (Assessment of functional recovery and axonal sprouting in oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) null mice after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci* 39:258-267.2008).

- Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y (Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell* 120:123-135.2005).
- Jiang W, Betson M, Mulloy R, Foster R, Levay M, Ligeti E, Settleman J (p190A RhoGAP is a glycogen synthase kinase-3- β substrate required for polarized cell migration. *J Biol Chem* 283:20978-20988.2008).
- Johnson MR, DeClue JE, Felzmann S, Vass WC, Xu G, White R, Lowy DR (Neurofibromin can inhibit Ras-dependent growth by a mechanism independent of its GTPase-accelerating function. *Molecular and cellular biology* 14:641-645.1994).
- Joo NY, Knowles JC, Lee GS, Kim JW, Kim HW, Son YJ, Hyun JK (Effects of phosphate glass fiber-collagen scaffolds on functional recovery of completely transected rat spinal cords. *Acta Biomater.*2012).
- Jope RS, Johnson GV (The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29:95-102.2004).
- Josephson A, Trifunovski A, Widmer HR, Widenfalk J, Olson L, Spenger C (Nogo-receptor gene activity: cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. *The Journal of comparative neurology* 453:292-304.2002).
- Josephson A, Widenfalk J, Widmer HW, Olson L, Spenger C (NOGO mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Experimental neurology* 169:319-328.2001).
- Juurlink BH, Paterson PG (Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med* 21:309-334.1998).
- Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano HJ, Ikegami T, Moriya A, Konishi O, Nakayama C, Kumagai K, Kimura T, Sato Y, Goshima Y, Taniguchi M, Ito M, He Z, Toyama Y, Okano H (A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 12:1380-1389.2006).
- Kaptanoglu E, Solaroglu I, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E (Blockade of sodium channels by phenytoin protects ultrastructure and attenuates lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Acta Neurochir (Wien)* 147:405-412; discussion 412.2005).
- Karabay A, Yu W, Solowska JM, Baird DH, Baas PW (Axonal growth is sensitive to the levels of katanin, a protein that severs microtubules. *J Neurosci* 24:5778-5788.2004).
- Kaytor MD, Orr HT (The GSK3 β signaling cascade and neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurobiol* 12:275-278.2002).
- Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O (Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 25:4694-4705.2005).
- Kelm S, Schauer R, Crocker PR (The Sialoadhesins--a family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily. *Glycoconj J* 13:913-926.1996).
- Kerschensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW, Misgeld T (In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med* 11:572-577.2005).
- Kikuchi K, Kishino A, Konishi O, Kumagai K, Hosotani N, Saji I, Nakayama C, Kimura T (In vitro and in vivo characterization of a novel semaphorin 3A inhibitor, SM-216289 or xanthofulvin. *J Biol Chem* 278:42985-42991.2003).
- Kim JE, Li S, GrandPre T, Qiu D, Strittmatter SM (Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron* 38:187-199.2003).

- Kim L, Kimmel AR (GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization. *Curr Drug Targets* 7:1411-1419.2006).
- Kim WY, Zhou FQ, Zhou J, Yokota Y, Wang YM, Yoshimura T, Kaibuchi K, Woodgett JR, Anton ES, Snider WD (Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron* 52:981-996.2006).
- Kim YT, Karthikeyan K, Chirvi S, Dave DP (Neuro-optical microfluidic platform to study injury and regeneration of single axons. *Lab Chip* 9:2576-2581.2009).
- Kimura T, Yamashita S, Nakao S, Park JM, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Sahara N, Takashima A (GSK-3beta is required for memory reconsolidation in adult brain. *PLoS One* 3:e3540.2008).
- Klein R (Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nat Neurosci* 12:15-20.2009).
- Kobayashi M, Nishita M, Mishima T, Ohashi K, Mizuno K (MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *EMBO J* 25:713-726.2006).
- Kojima T, Morikawa Y, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Senba E, Kitamura T (TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *The Journal of biological chemistry* 275:20742-20747.2000).
- Kolch W (Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:827-837.2005).
- Koprivica V, Cho KS, Park JB, Yiu G, Atwal J, Gore B, Kim JA, Lin E, Tessier-Lavigne M, Chen DF, He Z (EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Science* 310:106-110.2005).
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2:1389-1397.1989).
- Kottis V, Thibault P, Mikol D, Xiao ZC, Zhang R, Dergham P, Braun PE (Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurochem* 82:1566-1569.2002).
- Krassioukov A, Claydon VE (The clinical problems in cardiovascular control following spinal cord injury: an overview. *Prog Brain Res* 152:223-229.2006).
- Krylova O, Herreros J, Cleverley KE, Ehler E, Henriquez JP, Hughes SM, Salinas PC (WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. *Neuron* 35:1043-1056.2002).
- Kubagawa H, Burrows PD, Cooper MD (A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5261-5266.1997).
- Kury P, Abankwa D, Kruse F, Greiner-Petter R, Muller HW (Gene expression profiling reveals multiple novel intrinsic and extrinsic factors associated with axonal regeneration failure. *Eur J Neurosci* 19:32-42.2004).
- Kwo S, Young W, Decrescito V (Spinal cord sodium, potassium, calcium, and water concentration changes in rats after graded contusion injury. *J Neurotrauma* 6:13-24.1989).
- Kwok JC, Afshari F, Garcia-Alias G, Fawcett JW (Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restorative neurology and neuroscience* 26:131-145.2008).
- Lau E, Margolis RU (Inhibitors of slit protein interactions with the heparan sulphate proteoglycan glypican-1: potential agents for the treatment of spinal cord injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:417-421.2010).
- Lau KF, Miller CC, Anderton BH, Shaw PC (Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues. *J Pept Res* 54:85-91.1999).
- Laverty PH, Leskovar A, Breur GJ, Coates JR, Bergman RL, Widmer WR, Toombs JP, Shapiro S, Borgens RB (A preliminary study of intravenous surfactants in

- paraplegic dogs: polymer therapy in canine clinical SCI. *J Neurotrauma* 21:1767-1777.2004).
- Lee H, Raiker SJ, Venkatesh K, Geary R, Robak LA, Zhang Y, Yeh HH, Shrager P, Giger RJ (Synaptic function for the Nogo-66 receptor NgR1: regulation of dendritic spine morphology and activity-dependent synaptic strength. *J Neurosci* 28:2753-2765.2008).
- Lee JK, Geoffroy CG, Chan AF, Tolentino KE, Crawford MJ, Leal MA, Kang B, Zheng B (Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron* 66:663-670.2010).
- Lee JN, Jiang X, Ryan D, Whitesides GM (Compatibility of mammalian cells on surfaces of poly(dimethylsiloxane). *Langmuir* 20:11684-11691.2004).
- Lee JN, Park C, Whitesides GM (Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Anal Chem* 75:6544-6554.2003).
- Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M (Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386:833-838.1997).
- Leroy A, Landrieu I, Huvent I, Legrand D, Codeville B, Wieruszeski JM, Lippens G (Spectroscopic studies of GSK3 β phosphorylation of the neuronal tau protein and its interaction with the N-terminal domain of apolipoprotein E. *J Biol Chem* 285:33435-33444.2010).
- Levine JM, Ruaux CG, Bergman RL, Coates JR, Steiner JM, Williams DA (Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease. *Am J Vet Res* 67:283-287.2006).
- Lewis AK, Bridgman PC (Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol* 119:1219-1243.1992).
- Li M, Shi J, Wei Z, Teng FY, Tang BL, Song J (Structural characterization of the human Nogo-A functional domains. Solution structure of Nogo-40, a Nogo-66 receptor antagonist enhancing injured spinal cord regeneration. *Eur J Biochem* 271:3512-3522.2004a).
- Li Q, Qi B, Oka K, Shimakage M, Yoshioka N, Inoue H, Hakura A, Kodama K, Stanbridge EJ, Yutsudo M (Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. *Oncogene* 20:3929-3936.2001).
- Li S, Liu BP, Budel S, Li M, Ji B, Walus L, Li W, Jirik A, Rabacchi S, Choi E, Worley D, Sah DW, Pepinsky B, Lee D, Relton J, Strittmatter SM (Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury. *J Neurosci* 24:10511-10520.2004b).
- Li S, Strittmatter SM (Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury. *J Neurosci* 23:4219-4227.2003).
- Li T, Hawkes C, Qureshi HY, Kar S, Paudel HK (Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3 β . *Biochemistry* 45:3134-3145.2006).
- Li W, Walus L, Rabacchi SA, Jirik A, Chang E, Schauer J, Zheng BH, Benedetti NJ, Liu BP, Choi E, Worley D, Silvian L, Mo W, Mullen C, Yang W, Strittmatter SM, Sah DW, Pepinsky B, Lee DH (A neutralizing anti-Nogo66 receptor monoclonal antibody reverses inhibition of neurite outgrowth by central nervous system myelin. *J Biol Chem* 279:43780-43788.2004c).
- Li Y, Raisman G (Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 14:4050-4063.1994).
- Lin CH, Forscher P (Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron* 14:763-771.1995).

- Liu-Snyder P, Logan MP, Shi R, Smith DT, Borgens RB (Neuroprotection from secondary injury by polyethylene glycol requires its internalization. *J Exp Biol* 210:1455-1462.2007).
- Liu BP, Cafferty WB, Budel SO, Strittmatter SM (Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1593-1610.2006a).
- Liu CN, Chambers WW (Intraspinal sprouting of dorsal root axons; development of new collaterals and preterminals following partial denervation of the spinal cord in the cat. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 79:46-61.1958).
- Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC (Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell* 21:521-531.2006b).
- Liu SJ, Zhang AH, Li HL, Wang Q, Deng HM, Netzer WJ, Xu H, Wang JZ (Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory. *J Neurochem* 87:1333-1344.2003a).
- Liu X, Hawkes E, Ishimaru T, Tran T, Sretavan DW (EphB3: an endogenous mediator of adult axonal plasticity and regrowth after CNS injury. *J Neurosci* 26:3087-3101.2006c).
- Liu YY, Jin WL, Liu HL, Ju G (Electron microscopic localization of Nogo-A at the postsynaptic active zone of the rat. *Neurosci Lett* 346:153-156.2003b).
- Lopez-Bendito G, Flames N, Ma L, Fouquet C, Di Meglio T, Chedotal A, Tessier-Lavigne M, Marin O (Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain. *J Neurosci* 27:3395-3407.2007).
- Low K, Culbertson M, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Tuszynski MH (Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. *J Neurosci* 28:1099-1108.2008a).
- Low LK, Liu XB, Faulkner RL, Coble J, Cheng HJ (Plexin signaling selectively regulates the stereotyped pruning of corticospinal axons from visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8136-8141.2008b).
- Lucas FR, Goold RG, Gordon-Weeks PR, Salinas PC (Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J Cell Sci* 111 (Pt 10):1351-1361.1998).
- Ludwin SK (Oligodendrocyte survival in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol* 80:184-191.1990).
- Luo J (Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett* 273:194-200.2009).
- Luo J, Borgens R, Shi R (Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury. *J Neurochem* 83:471-480.2002).
- Llorens F, Gil V, del Rio JA (Emerging functions of myelin-associated proteins during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. *FASEB J* 25:463-475.2011).
- Llorens F, Gil V, Iraola S, Carim-Todd L, Marti E, Estivill X, Soriano E, del Rio JA, Sumoy L (Developmental analysis of Lingo-1/Lern1 protein expression in the mouse brain: interaction of its intracellular domain with Myt1l. *Dev Neurobiol* 68:521-541.2008).
- Ma D, Chow S, Obrocka M, Connors T, Fischer I (Induction of microtubule-associated protein 1B expression in Schwann cells during nerve regeneration. *Brain Res* 823:141-153.1999).
- MacAulay K, Doble BW, Patel S, Hansotia T, Sinclair EM, Drucker DJ, Nagy A, Woodgett JR (Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab* 6:329-337.2007).

- MacDermid VE, McPhail LT, Tsang B, Rosenthal A, Davies A, Ramer MS (A soluble Nogo receptor differentially affects plasticity of spinally projecting axons. *Eur J Neurosci* 20:2567-2579.2004).
- Manitt C, Colicos MA, Thompson KM, Rousselle E, Peterson AC, Kennedy TE (Widespread expression of netrin-1 by neurons and oligodendrocytes in the adult mammalian spinal cord. *J Neurosci* 21:3911-3922.2001).
- Marillat V, Cases O, Nguyen-Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chedotal A (Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* 442:130-155.2002).
- Marin O, Plump AS, Flames N, Sanchez-Camacho C, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130:1889-1901.2003).
- Martin I, Andres CR, Vedrine S, Tabagh R, Michelle C, Jourdan ML, Heuze-Vourc'h N, Corcia P, Duittoz A, Vourc'h P (Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells. *Brain Res* 1284:22-30.2009).
- Mathis C, Schroter A, Thallmair M, Schwab ME (Nogo-a regulates neural precursor migration in the embryonic mouse cortex. *Cereb Cortex* 20:2380-2390.2010).
- Matus A (Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J Physiol (Paris)* 84:134-137.1990).
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrizzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34:807-820.2002).
- McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW, Strittmatter SM (Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science* 309:2222-2226.2005).
- McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR (The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci* 19:10778-10788.1999).
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J (Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 11:3398-3411.1991).
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE (Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13:805-811.1994).
- Meier S, Brauer AU, Heimrich B, Schwab ME, Nitsch R, Savaskan NE (Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. *FASEB J* 17:1153-1155.2003).
- Meijer L, Flajolet M, Greengard P (Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci* 25:471-480.2004).
- Melani R, Rebaudo R, Noraberg J, Zimmer J, Balestrino M (Changes in extracellular action potential detect kainic acid and trimethyltin toxicity in hippocampal slice preparations earlier than do MAP2 density measurements. *Altern Lab Anim* 33:379-386.2005).
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM, Pepinsky RB (LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 7:221-228.2004).
- Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulag-Morskaya S, Shao Z, Chang J, Thill G, Levesque M, Zhang M, Hession C, Sah D, Trapp B, He Z, Jung V, McCoy JM, Pepinsky RB (LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 8:745-751.2005).

- Miklossy J, Van der Loos H (The long-distance effects of brain lesions: visualization of myelinated pathways in the human brain using polarizing and fluorescence microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:1-15.1991).
- Mikol DD, Alexakos MJ, Bayley CA, Lemons RS, Le Beau MM, Stefansson K (Structure and chromosomal localization of the gene for the oligodendrocyte-myelin glycoprotein. *The Journal of cell biology* 111:2673-2679.1990a).
- Mikol DD, Gulcher JR, Stefansson K (The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. *The Journal of cell biology* 110:471-479.1990b).
- Mikol DD, Stefansson K (A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes. *J Cell Biol* 106:1273-1279.1988).
- Milward E, Kim KJ, Szklarczyk A, Nguyen T, Melli G, Nayak M, Deshpande D, Fitzsimmons C, Hoke A, Kerr D, Griffin JW, Calabresi PA, Conant K (Cleavage of myelin associated glycoprotein by matrix metalloproteinases. *J Neuroimmunol* 193:140-148.2008).
- Mimura F, Yamagishi S, Arimura N, Fujitani M, Kubo T, Kaibuchi K, Yamashita T (Myelin-associated glycoprotein inhibits microtubule assembly by a Rho-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281:15970-15979.2006).
- Mingorance-Le Meur A, Zheng B, Soriano E, del Rio JA (Involvement of the myelin-associated inhibitor Nogo-A in early cortical development and neuronal maturation. *Cereb Cortex* 17:2375-2386.2007).
- Mingorance A, Fontana X, Sole M, Burgaya F, Urena JM, Teng FY, Tang BL, Hunt D, Anderson PN, Bethea JR, Schwab ME, Soriano E, del Rio JA (Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Mol Cell Neurosci* 26:34-49.2004).
- Mingorance A, Fontana X, Soriano E, Del Rio JA (Overexpression of myelin-associated glycoprotein after axotomy of the perforant pathway. *Mol Cell Neurosci* 29:471-483.2005).
- Mingorance A, Sole M, Muneton V, Martinez A, Nieto-Sampedro M, Soriano E, del Rio JA (Regeneration of lesioned entorhino-hippocampal axons in vitro by combined degradation of inhibitory proteoglycans and blockade of Nogo-66/NgR signaling. *FASEB J* 20:491-493.2006).
- Minturn JE, Fryer HJ, Geschwind DH, Hockfield S (TOAD-64, a gene expressed early in neuronal differentiation in the rat, is related to unc-33, a *C. elegans* gene involved in axon outgrowth. *J Neurosci* 15:6757-6766.1995).
- Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Twiss JL (Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8473-8478.2004).
- Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, Henke-Fahle S, Mueller BK (The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Molecular and cellular neurosciences* 22:319-330.2003).
- Montani L, Gerrits B, Gehrig P, Kempf A, Dimou L, Wollscheid B, Schwab ME (Neuronal Nogo-A modulates growth cone motility via Rho-GTP/LIMK1/cofilin in the unlesioned adult nervous system. *J Biol Chem* 284:10793-10807.2009).
- Montolio M, Messeguer J, Masip I, Guijarro P, Gavin R, Antonio Del Rio J, Messeguer A, Soriano E (A semaphorin 3A inhibitor blocks axonal chemorepulsion and enhances axon regeneration. *Chem Biol* 16:691-701.2009).
- Morales R, Riss M, Wang L, Gavin R, Del Rio J, Alcubilla R, Claverol-Tinture E (Integrating multi-unit extracellular electrophysiology and plastic culture dishes for network neuroscience. *Lab on a chip* In press.2008a).

- Morales R, Riss M, Wang L, Gavin R, Del Rio JA, Alcubilla R, Claverol-Tinture E (Integrating multi-unit electrophysiology and plastic culture dishes for network neuroscience. *Lab Chip* 8:1896-1905.2008b).
- Moreau-Fauvarque C, Kumanogoh A, Camand E, Jaillard C, Barbin G, Boquet I, Love C, Jones EY, Kikutani H, Lubetzki C, Dusart I, Chedotal A (The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J Neurosci* 23:9229-9239.2003).
- Morita T, Sobue K (Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J Biol Chem* 284:27734-27745.2009).
- Mrksich M, Whitesides GM (Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 25:55-78.1996).
- Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT (A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13:757-767.1994).
- Munoz-Montano JR, Lim F, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J (Glycogen Synthase Kinase-3 Modulates Neurite Outgrowth in Cultured Neurons: Possible Implications for Neurite Pathology in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 1:361-378.1999).
- Murinson BB, Archer DR, Li Y, Griffin JW (Degeneration of myelinated efferent fibers prompts mitosis in Remak Schwann cells of uninjured C-fiber afferents. *J Neurosci* 25:1179-1187.2005).
- Murray AJ, Peace AG, Shewan DA (cGMP promotes neurite outgrowth and growth cone turning and improves axon regeneration on spinal cord tissue in combination with cAMP. *Brain Res* 1294:12-21.2009).
- Myers RR, Sekiguchi Y, Kikuchi S, Scott B, Medicherla S, Protter A, Campana WM (Inhibition of p38 MAP kinase activity enhances axonal regeneration. *Exp Neurol* 184:606-614.2003).
- Nandini CD, Sugahara K (Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its biological activities and in the binding of growth factors. *Adv Pharmacol* 53:253-279.2006).
- Nash HH, Borke RC, Anders JJ (Ensheathing cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. *J Neurosci* 22:7111-7120.2002).
- Negishi M, Oinuma I, Katoh H (Plexins: axon guidance and signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 62:1363-1371.2005).
- Nehrt A, Rodgers R, Shapiro S, Borgens R, Shi R (The critical role of voltage-dependent calcium channel in axonal repair following mechanical trauma. *Neuroscience* 146:1504-1512.2007).
- Neumann S, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Basbaum AI (Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* 34:885-893.2002).
- Ng JM, Gitlin I, Stroock AD, Whitesides GM (Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems. *Electrophoresis* 23:3461-3473.2002).
- Ng WP, Lozano AM (Neuronal age influences the response to neurite outgrowth inhibitory activity in the central and peripheral nervous systems. *Brain Res* 836:49-61.1999).
- Nguyen-Ba-Charvet KT, Picard-Riera N, Tessier-Lavigne M, Baron-Van Evercooren A, Sotelo C, Chedotal A (Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 24:1497-1506.2004).
- Nie DY, Ma QH, Law JW, Chia CP, Dhingra NK, Shimoda Y, Yang WL, Gong N, Chen QW, Xu G, Hu QD, Chow PK, Ng YK, Ling EA, Watanabe K, Xu TL, Habib AA,

- Schachner M, Xiao ZC (Oligodendrocytes regulate formation of nodes of Ranvier via the recognition molecule OMgp. *Neuron Glia Biol* 2:151-164.2006).
- Niederost B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE (Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* 22:10368-10376.2002).
- Nishimura T, Fukata Y, Kato K, Yamaguchi T, Matsuura Y, Kamiguchi H, Kaibuchi K (CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat Cell Biol* 5:819-826.2003).
- Norton WT, Poduslo SE (Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem* 21:749-757.1973).
- Nunez PL (A study of origins of the time dependencies of scalp EEG: i--theoretical basis. *IEEE Trans Biomed Eng* 28:271-280.1981a).
- Nunez PL (A study of origins of the time dependencies of scalp EEG: ii--experimental support of theory. *IEEE Trans Biomed Eng* 28:281-288.1981b).
- Nuydens R, Dispersyn G, de Jong M, van den Kieboom G, Borgers M, Geerts H (Aberrant tau phosphorylation and neurite retraction during NGF deprivation in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 240:687-691.1997).
- O'Brien WT, Harper AD, Jove F, Woodgett JR, Maretto S, Piccolo S, Klein PS (Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci* 24:6791-6798.2004).
- Oertle T, Schwab ME (Nogo and its paRTNers. *Trends Cell Biol* 13:187-194.2003).
- Oertle T, van der Haar ME, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, Huber AB, Simonen M, Schnell L, Brosamle C, Kaupmann K, Vallon R, Schwab ME (Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci* 23:5393-5406.2003).
- Oh MJ, Seo TB, Kwon KB, Yoon SJ, Elzi DJ, Kim BG, Namgung U (Axonal outgrowth and Erk1/2 activation by training after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 26:2071-2082.2009).
- Olby NJ, Sharp NJ, Munana KR, Papich MG (Chronic and acute compressive spinal cord lesions in dogs due to intervertebral disc herniation are associated with elevation in lumbar cerebrospinal fluid glutamate concentration. *J Neurotrauma* 16:1215-1224.1999).
- Omoto S, Ueno M, Mochio S, Takai T, Yamashita T (Genetic deletion of paired immunoglobulin-like receptor B does not promote axonal plasticity or functional recovery after traumatic brain injury. *J Neurosci* 30:13045-13052.2010).
- Ong Tone S, Dayanandan B, Fournier AE, Mandato CA (GSK3 regulates mitotic chromosomal alignment through CRMP4. *PLoS One* 5:e14345.2010).
- Owen R, Gordon-Weeks PR (Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta in sensory neurons in culture alters filopodia dynamics and microtubule distribution in growth cones. *Mol Cell Neurosci* 23:626-637.2003).
- Papadopoulos CM, Tsai SY, Alsbie T, O'Brien TE, Schwab ME, Kartje GL (Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat. *Ann Neurol* 51:433-441.2002).
- Pardo R, Andreolotti AG, Ramos B, Picatoste F, Claro E (Opposed effects of lithium on the MEK-ERK pathway in neural cells: inhibition in astrocytes and stimulation in neurons by GSK3 independent mechanisms. *J Neurochem* 87:417-426.2003).
- Park E, Velumian AA, Fehlings MG (The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma* 21:754-774.2004).
- Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL, Garcia KC, He Z (A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 45:345-351.2005).

- Park JW, Kim HJ, Byun JH, Ryu HR, Jeon NL (Novel microfluidic platform for culturing neurons: culturing and biochemical analysis of neuronal components. *Biotechnol J* 4:1573-1577.2009).
- Park KK, Liu K, Hu Y, Kanter JL, He Z (PTEN/mTOR and axon regeneration. *Exp Neurol* 223:45-50.2010).
- Parker KK, Brock AL, Brangwynne C, Mannix RJ, Wang N, Ostuni E, Geisse NA, Adams JC, Whitesides GM, Ingber DE (Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J* 16:1195-1204.2002).
- Pasterkamp RJ, Giger RJ (Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol* 19:263-274.2009).
- Pasterkamp RJ, Kolk SM, Hellemons AJ, Kolodkin AL (Expression patterns of semaphorin7A and plexinC1 during rat neural development suggest roles in axon guidance and neuronal migration. *BMC Dev Biol* 7:98.2007).
- Pasterkamp RJ, Kolodkin AL (Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 13:79-89.2003).
- Pasterkamp RJ, Ruitenbergh MJ, Verhaagen J (Semaphorins and their receptors in olfactory axon guidance. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45:763-779.1999).
- Pasterkamp RJ, Verhaagen J (Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 35:36-54.2001).
- Pasterkamp RJ, Verhaagen J (Semaphorins in axon regeneration: developmental guidance molecules gone wrong? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1499-1511.2006).
- Pearse DD, Pereira FC, Marcillo AE, Bates ML, Berrocal YA, Filbin MT, Bunge MB (cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10:610-616.2004).
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-183.2001).
- Pedraza L, Frey AB, Hempstead BL, Colman DR, Salzer JL (Differential expression of MAG isoforms during development. *J Neurosci Res* 29:141-148.1991).
- Peng X, Zhou Z, Hu J, Fink DJ, Mata M (Soluble Nogo receptor down-regulates expression of neuronal Nogo-A to enhance axonal regeneration. *J Biol Chem* 285:2783-2795.2010).
- Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A (Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons in vivo. *J Neurochem* 93:72-83.2005).
- Pernet V, Joly S, Christ F, Dimou L, Schwab ME (Nogo-A and myelin-associated glycoprotein differently regulate oligodendrocyte maturation and myelin formation. *J Neurosci* 28:7435-7444.2008).
- Petrinovic MM, Duncan CS, Bourikas D, Weinman O, Montani L, Schroeter A, Maerki D, Sommer L, Stoeckli ET, Schwab ME (Neuronal Nogo-A regulates neurite fasciculation, branching and extension in the developing nervous system. *Development* 137:2539-2550.2010).
- Pigino G, Paglini G, Ulloa L, Avila J, Caceres A (Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *J Cell Sci* 110 (Pt 2):257-270.1997).
- Pignot V, Hein AE, Barske C, Wiessner C, Walmsley AR, Kaupmann K, Mayeur H, Sommer B, Mir AK, Frentzel S (Characterization of two novel proteins, NgRH1 and NgRH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *Journal of neurochemistry* 85:717-728.2003).
- Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, Mason CA, Tessier-Lavigne M (Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33:219-232.2002).

- Polak P, Hall MN (mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 21:209-218.2009).
- Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT (Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 158:351-365.1999).
- Prinjha R, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, Michalovich D, Simmons DL, Walsh FS (Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 403:383-384.2000).
- Qian T, Wang Y (Micro/nano-fabrication technologies for cell biology. *Med Biol Eng Comput* 48:1023-1032.2010).
- Qin H, Pu HX, Li M, Ahmed S, Song J (Identification and structural mechanism for a novel interaction between a ubiquitin ligase WWP1 and Nogo-A, a key inhibitor for central nervous system regeneration. *Biochemistry* 47:13647-13658.2008).
- Quarles RH (A hypothesis about the relationship of myelin-associated glycoprotein's function in myelinated axons to its capacity to inhibit neurite outgrowth. *Neurochemical research* 34:79-86.2009).
- Quinn CC, Gray GE, Hockfield S (A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. *J Neurobiol* 41:158-164.1999).
- Raiker SJ, Lee H, Baldwin KT, Duan Y, Shrager P, Giger RJ (Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* 30:12432-12445.2010).
- Raineteau O, Fouad K, Noth P, Thallmair M, Schwab ME (Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6929-6934.2001).
- Ramer LM, Au E, Richter MW, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ (Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *J Comp Neurol* 473:1-15.2004).
- Ramon-Cueto A, Avila J (Two modes of microtubule-associated protein 1B phosphorylation are differentially regulated during peripheral nerve regeneration. *Brain Res* 815:213-226.1999).
- Reszka AA, Bulinski JC, Krebs EG, Fischer EH (Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 2 regulates cytoskeletal organization and chemotaxis via catalytic and microtubule-specific interactions. *Mol Biol Cell* 8:1219-1232.1997).
- Rhodes KE, Fawcett JW (Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* 204:33-48.2004).
- Rhodes KE, Moon LD, Fawcett JW (Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: effects on axon regeneration in the CNS. *Neuroscience* 120:41-56.2003).
- Richard M, Giannetti N, Saucier D, Sacquet J, Jourdan F, Pellier-Monnin V (Neuronal expression of Nogo-A mRNA and protein during neurite outgrowth in the developing rat olfactory system. *Eur J Neurosci* 22:2145-2158.2005).
- Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR, Ma ST, Reeder JW, Samuels I, Slabiak T, Wagman AS, Hammond ME, Harrison SD (Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes* 52:588-595.2003).
- Robak LA, Venkatesh K, Lee H, Raiker SJ, Duan Y, Lee-Osbourne J, Hofer T, Mage RG, Rader C, Giger RJ (Molecular basis of the interactions of the Nogo-66 receptor and its homolog NgR2 with myelin-associated glycoprotein: development of NgROMNI-Fc, a novel antagonist of CNS myelin inhibition. *J Neurosci* 29:5768-5783.2009).
- Rolls A, Shechter R, Schwartz M (The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci* 10:235-241.2009).

- Romanova EV, Fosser KA, Rubakhin SS, Nuzzo RG, Sweedler JV (Engineering the morphology and electrophysiological parameters of cultured neurons by microfluidic surface patterning. *FASEB J* 18:1267-1269.2004).
- Roux PP, Barker PA (Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in neurobiology* 67:203-233.2002).
- Salzer JL (Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* 40:297-318.2003).
- Sanchez S, Sayas CL, Lim F, Diaz-Nido J, Avila J, Wandosell F (The inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3. *J Neurochem* 78:468-481.2001).
- Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A (Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 46:225-251.2004).
- Sato-Yoshitake R, Shiomura Y, Miyasaka H, Hirokawa N (Microtubule-associated protein 1B: molecular structure, localization, and phosphorylation-dependent expression in developing neurons. *Neuron* 3:229-238.1989).
- Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T (Nogo-A and nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:129-138.2005).
- Sayas CL, Moreno-Flores MT, Avila J, Wandosell F (The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. *J Biol Chem* 274:37046-37052.1999).
- Schachner M, Bartsch U (Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia* 29:154-165.2000).
- Schnell L, Schwab ME (Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 343:269-272.1990).
- Schultke E, Kendall E, Kamencic H, Ghong Z, Griebel RW, Juurlink BH (Quercetin promotes functional recovery following acute spinal cord injury. *J Neurotrauma* 20:583-591.2003).
- Schwab ME (Repairing the injured spinal cord. *Science* 295:1029-1031.2002).
- Schwab ME (Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 11:799-811.2010).
- Schwartz M, Butovsky O, Kipnis J (Does inflammation in an autoimmune disease differ from inflammation in neurodegenerative diseases? Possible implications for therapy. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:4-10.2006).
- Schwartz M, Yoles E (Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond. *J Neurotrauma* 23:360-370.2006).
- Seira O, Gavin R, Gil V, Llorens F, Rangel A, Soriano E, del Rio JA (Neurites regrowth of cortical neurons by GSK3beta inhibition independently of Nogo receptor 1. *J Neurochem* 113:1644-1658.2010).
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001-1014.1996).
- Settleman J, Narasimhan V, Foster LC, Weinberg RA (Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell* 69:539-549.1992).
- Shamash S, Reichert F, Rotshenker S (The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* 22:3052-3060.2002).
- Shao Z, Browning JL, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, Thill G, Levesque M, Sah D, McCoy JM, Murray B, Jung V, Pepinsky RB, Mi S (TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron* 45:353-359.2005).

- Shaw M, Cohen P, Alessi DR (Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS Lett* 416:307-311.1997).
- Shearer MC, Fawcett JW (The astrocyte/meningeal cell interface--a barrier to successful nerve regeneration? *Cell Tissue Res* 305:267-273.2001).
- Shearer MC, Niclou SP, Brown D, Asher RA, Holtmaat AJ, Levine JM, Verhaagen J, Fawcett JW (The astrocyte/meningeal cell interface is a barrier to neurite outgrowth which can be overcome by manipulation of inhibitory molecules or axonal signalling pathways. *Mol Cell Neurosci* 24:913-925.2003).
- Shen Y, Tenney AP, Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, Liu K, He Z, Silver J, Flanagan JG (PTP σ is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science (New York, NY)* 326:592-596.2009).
- Shestopalov AA, Clark RL, Toone EJ (Inkless microcontact printing on SAMs of Boc- and TBS-protected thiols. *Nano Lett* 10:43-46.2010).
- Sheu JY, Kulhanek DJ, Eckenstein FP (Differential patterns of ERK and STAT3 phosphorylation after sciatic nerve transection in the rat. *Exp Neurol* 166:392-402.2000).
- Shimizu I, Oppenheim RW, O'Brien M, Shneiderman A (Anatomical and functional recovery following spinal cord transection in the chick embryo. *J Neurobiol* 21:918-937.1990).
- Sia SK, Whitesides GM (Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis* 24:3563-3576.2003).
- Sigworth FJ, Klemic KG (Microchip technology in ion-channel research. *IEEE Trans Nanobioscience* 4:121-127.2005).
- Silver J, Miller JH (Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.2004).
- Simo S, Pujadas L, Segura MF, La Torre A, Del Rio JA, Urena JM, Comella JX, Soriano E (Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation. *Cereb Cortex* 17:294-303.2007).
- Sivasankaran R, Pei J, Wang KC, Zhang YP, Shields CB, Xu XM, He Z (PKC mediates inhibitory effects of myelin and chondroitin sulfate proteoglycans on axonal regeneration. *Nat Neurosci* 7:261-268.2004).
- Smith DG, Buffet M, Fenwick AE, Haigh D, Ife RJ, Saunders M, Slingsby BP, Stacey R, Ward RW (3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorg Med Chem Lett* 11:635-639.2001).
- Sole M, Fontana X, Gavin R, Soriano E, del Rio JA (Bcl-2 overexpression does not promote axonal regeneration of the entorhino-hippocampal connections in vitro after axotomy. *Brain Res* 1020:204-209.2004).
- Song XY, Zhong JH, Wang X, Zhou XF (Suppression of p75^{NTR} does not promote regeneration of injured spinal cord in mice. *J Neurosci* 24:542-546.2004).
- Sorribas H, Padeste C, Mezzacasa T, Tiefenauer L, Leder L, Fitzli D, Sonderegger P (Neurite outgrowth on microstructured surfaces functionalized by a neural adhesion protein. *J Mater Sci Mater Med* 10:787-791.1999).
- Sorribas H, Padeste C, Tiefenauer L (Photolithographic generation of protein micropatterns for neuron culture applications. *Biomaterials* 23:893-900.2002).
- Soussou WV, Yoon GJ, Brinton RD, Berger TW (Neuronal network morphology and electrophysiology of hippocampal neurons cultured on surface-treated multielectrode arrays. *IEEE Trans Biomed Eng* 54:1309-1320.2007).
- Soutar MP, Thornhill P, Cole AR, Sutherland C (Increased CRMP2 phosphorylation is observed in Alzheimer's disease; does this tell us anything about disease development? *Curr Alzheimer Res* 6:269-278.2009).
- Stenger DA, Hickman JJ, Bateman KE, Ravenscroft MS, Ma W, Pancrazio JJ, Shaffer K, Schaffner AE, Cribbs DH, Cotman CW (Microlithographic determination of

- axonal/dendritic polarity in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Methods* 82:167-173.1998).
- Steward O, Zheng B, Banos K, Yee KM (Response to: Kim et al., "axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B." *Neuron* 38, 187-199. *Neuron* 54:191-195.2007).
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.1991).
- Straley KS, Foo CW, Heilshorn SC (Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries. *J Neurotrauma* 27:1-19.2010).
- Su Y, Wang F, Zhao SG, Pan SH, Liu P, Teng Y, Cui H (Axonal regeneration after optic nerve crush in Nogo-A/B/C knockout mice. *Mol Vis* 14:268-273.2008).
- Sumiyoshi K, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Satoh JI (Protein microarray analysis identifies cyclic nucleotide phosphodiesterase as an interactor of Nogo-A. *Neuropathology*.2009).
- Sun W, Qureshi HY, Cafferty PW, Sobue K, Agarwal-Mawal A, Neufeld KD, Paudel HK (Glycogen synthase kinase-3beta is complexed with tau protein in brain microtubules. *J Biol Chem* 277:11933-11940.2002).
- Suzuki Y, Nakagomi S, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Inagaki N, Kaibuchi K, Aizawa H, Kikuchi K, Kiyama H (Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured motor neurons of rat. *J Neurochem* 86:1042-1050.2003).
- Sweatt JD (The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76:1-10.2001).
- Syken J, Grandpre T, Kanold PO, Shatz CJ (PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science* 313:1795-1800.2006).
- Tagami S, Eguchi Y, Kinoshita M, Takeda M, Tsujimoto Y (A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* 19:5736-5746.2000).
- Takahashi M, Yasutake K, Tomizawa K (Lithium inhibits neurite growth and tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta-dependent phosphorylation of juvenile tau in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 73:2073-2083.1999).
- Takai T, Ono M (Activating and inhibitory nature of the murine paired immunoglobulin-like receptor family. *Immunol Rev* 181:215-222.2001).
- Takei Y (Phosphorylation of Nogo receptors suppresses Nogo signaling, allowing neurite regeneration. *Sci Signal* 2:ra14.2009).
- Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N (Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* 150:989-1000.2000).
- Tan EY, Law JW, Wang CH, Lee AY (Development of a cell transducible RhoA inhibitor TAT-C3 transferase and its encapsulation in biocompatible microspheres to promote survival and enhance regeneration of severed neurons. *Pharm Res* 24:2297-2308.2007).
- Tanaka E, Ho T, Kirschner MW (The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J Cell Biol* 128:139-155.1995).
- Tanaka E, Kirschner MW (The role of microtubules in growth cone turning at substrate boundaries. *J Cell Biol* 128:127-137.1995).
- Tanaka E, Sabry J (Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83:171-176.1995).
- Tanaka EM, Kirschner MW (Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *J Cell Biol* 115:345-363.1991).
- Tang S, Qiu J, Nikulina E, Filbin MT (Soluble myelin-associated glycoprotein released from damaged white matter inhibits axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 18:259-269.2001).
- Tang S, Shen YJ, DeBellard ME, Mukhopadhyay G, Salzer JL, Crocker PR, Filbin MT (Myelin-associated glycoprotein interacts with neurons via a sialic acid binding

- site at ARG118 and a distinct neurite inhibition site. *J Cell Biol* 138:1355-1366.1997a).
- Tang S, Woodhall RW, Shen YJ, deBellard ME, Saffell JL, Doherty P, Walsh FS, Filbin MT (Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found in vivo inhibits axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 9:333-346.1997b).
- Tang W, Zhang Y, Xu W, Harden TK, Sondek J, Sun L, Li L, Wu D (A PLCbeta/PI3Kgamma-GSK3 signaling pathway regulates cofilin phosphatase slingshot2 and neutrophil polarization and chemotaxis. *Dev Cell* 21:1038-1050.2011).
- Tatagiba M, Rosahl S, Gharabaghi A, Blomer U, Brandis A, Skerra A, Samii M, Schwab ME (Regeneration of auditory nerve following complete sectioning and intrathecal application of the IN-1 antibody. *Acta Neurochir (Wien)* 144:181-187.2002).
- Tator CH, Fehlings MG (Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 75:15-26.1991).
- Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL (A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* 2:599-605.2005).
- Taylor SJ, Rosenzweig ES, McDonald JW, 3rd, Sakiyama-Elbert SE (Delivery of neurotrophin-3 from fibrin enhances neuronal fiber sprouting after spinal cord injury. *J Control Release* 113:226-235.2006).
- Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AG, Dodd J, Jessell TM (Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336:775-778.1988).
- Thomas R, Favell K, Morante-Redolat J, Pool M, Kent C, Wright M, Daignault K, Ferraro GB, Montcalm S, Durocher Y, Fournier A, Perez-Tur J, Barker PA (LGI1 is a Nogo receptor 1 ligand that antagonizes myelin-based growth inhibition. *J Neurosci* 30:6607-6612.2010).
- Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M (Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* 320:667-670.2008).
- Tolnay M, Probst A (The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies. *IUBMB Life* 55:299-305.2003).
- Tom VJ, Steinmetz MP, Miller JH, Doller CM, Silver J (Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:6531-6539.2004).
- Tozaki H, Kawasaki T, Takagi Y, Hirata T (Expression of Nogo protein by growing axons in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 104:111-119.2002).
- Trapp BD (Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann N Y Acad Sci* 605:29-43.1990).
- Trivedi N, Marsh P, Goold RG, Wood-Kaczmar A, Gordon-Weeks PR (Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J Cell Sci* 118:993-1005.2005).
- Tropak MB, Johnson PW, Dunn RJ, Roder JC (Differential splicing of MAG transcripts during CNS and PNS development. *Brain research* 464:143-155.1988).
- Trovo-Marqui AB, Tajara EH (Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet* 70:1-13.2006).
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5116-5121.2001).
- Uchida Y, Ohshima T, Sasaki Y, Suzuki H, Yanai S, Yamashita N, Nakamura F, Takei K, Ihara Y, Mikoshiba K, Kolattukudy P, Honnorat J, Goshima Y (Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of

- CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells* 10:165-179.2005).
- Udina E, Ladak A, Furey M, Brushart T, Tyreman N, Gordon T (Rolipram-induced elevation of cAMP or chondroitinase ABC breakdown of inhibitory proteoglycans in the extracellular matrix promotes peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 223:143-152.2010).
- Ulloa L, Avila J, Diaz-Nido J (Heterogeneity in the phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during rat brain development. *J Neurochem* 61:961-972.1993a).
- Ulloa L, Dombradi V, Diaz-Nido J, Szucs K, Gergely P, Friedrich P, Avila J (Dephosphorylation of distinct sites on microtubule-associated protein MAP1B by protein phosphatases 1, 2A and 2B. *FEBS Lett* 330:85-89.1993b).
- Vahidi B, Park JW, Kim HJ, Jeon NL (Microfluidic-based strip assay for testing the effects of various surface-bound inhibitors in spinal cord injury. *J Neurosci Methods* 170:188-196.2008).
- Vale RD (The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112:467-480.2003).
- Van Meeteren NL, Eggers R, Lankhorst AJ, Gispens WH, Hamers FP (Locomotor recovery after spinal cord contusion injury in rats is improved by spontaneous exercise. *J Neurotrauma* 20:1029-1037.2003).
- Vandecandelaere A, Pedrotti B, Utton MA, Calvert RA, Bayley PM (Differences in the regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2. *Cell Motil Cytoskeleton* 35:134-146.1996).
- Vecino E, Avila J (Distribution of the phosphorylated form of microtubule associated protein 1B in the fish visual system during optic nerve regeneration. *Brain Res Bull* 56:131-137.2001).
- Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, Mage R, Rader C, Giger RJ (The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci* 25:808-822.2005).
- Victoratos P, Yiangou M, Avramidis N, Hadjipetrou L (Regulation of cytokine gene expression by adjuvants in vivo. *Clin Exp Immunol* 109:569-578.1997).
- Vinson M, Strijbos PJ, Rowles A, Facci L, Moore SE, Simmons DL, Walsh FS (Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition. *J Biol Chem* 276:20280-20285.2001).
- Vourc'h P, Dessay S, Mbarek O, Marouillat Vedrine S, Muh JP, Andres C (The oligodendrocyte-myelin glycoprotein gene is highly expressed during the late stages of myelination in the rat central nervous system. *Brain research* 144:159-168.2003a).
- Vourc'h P, Moreau T, Arbion F, Marouillat-Vedrine S, Muh JP, Andres C (Oligodendrocyte myelin glycoprotein growth inhibition function requires its conserved leucine-rich repeat domain, not its glycosylphosphatidyl-inositol anchor. *Journal of neurochemistry* 85:889-897.2003b).
- Vyas AA, Schnaar RL (Brain gangliosides: functional ligands for myelin stability and the control of nerve regeneration. *Biochimie* 83:677-682.2001).
- Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H (Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci* 99:307-321.2005).
- Wada T, Penninger JM (Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23:2838-2849.2004).
- Wagenaar DA, Pine J, Potter SM (An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci* 7:11.2006).
- Walsh FS, Doherty P (Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:425-456.1997).

- Wang B, Xiao Z, Chen B, Han J, Gao Y, Zhang J, Zhao W, Wang X, Dai J (Nogo-66 promotes the differentiation of neural progenitors into astroglial lineage cells through mTOR-STAT3 pathway. *PLoS one* 3:e1856.2008a).
- Wang J, Chan CK, Taylor JS, Chan SO (The growth-inhibitory protein Nogo is involved in midline routing of axons in the mouse optic chiasm. *J Neurosci Res* 86:2581-2590.2008b).
- Wang J, Chan CK, Taylor JS, Chan SO (Localization of Nogo and its receptor in the optic pathway of mouse embryos. *J Neurosci Res* 86:1721-1733.2008c).
- Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z (P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420:74-78.2002a).
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z (Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417:941-944.2002b).
- Wang LH, Strittmatter SM (A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J Neurosci* 16:6197-6207.1996).
- Wang QM, Fiol CJ, DePaoli-Roach AA, Roach PJ (Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 269:14566-14574.1994).
- Wang X, Chun SJ, Treloar H, Vartanian T, Greer CA, Strittmatter SM (Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci* 22:5505-5515.2002c).
- Wang Y, Roach PJ (Inactivation of rabbit muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-3. Dominant role of the phosphorylation of Ser-640 (site-3a). *J Biol Chem* 268:23876-23880.1993).
- Watanabe A, Hasegawa M, Suzuki M, Takio K, Morishima-Kawashima M, Titani K, Arai T, Kosik KS, Ihara Y (In vivo phosphorylation sites in fetal and adult rat tau. *J Biol Chem* 268:25712-25717.1993).
- Watari A, Yutsudo M (Multi-functional gene ASY/Nogo/RTN-X/RTN4: apoptosis, tumor suppression, and inhibition of neuronal regeneration. *Apoptosis* 8:5-9.2003).
- Watson MW, Abdelgawad M, Ye G, Yonson N, Trottier J, Wheeler AR (Microcontact printing-based fabrication of digital microfluidic devices. *Anal Chem* 78:7877-7885.2006).
- Webb AA, Muir GD (The blood-brain barrier and its role in inflammation. *J Vet Intern Med* 14:399-411.2000).
- Wehrli P, Charnay Y, Vallet P, Zhu G, Harmony J, Aronow B, Tschopp J, Bouras C, Viard-Leveugle I, French LE, Giannakopoulos P (Inhibition of post-ischemic brain injury by clusterin overexpression. *Nat Med* 7:977-979.2001).
- Weibel DB, Garstecki P, Whitesides GM (Combining microscience and neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 15:560-567.2005).
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1858-1862.1975).
- Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW (Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain* 126:1628-1637.2003).
- Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A (Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mamm Genome* 10:154-160.1999).
- Whitesides GM, Ostuni E, Takayama S, Jiang X, Ingber DE (Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu Rev Biomed Eng* 3:335-373.2001).
- Williams R, Ryves WJ, Dalton EC, Eickholt B, Shaltiel G, Agam G, Harwood AJ (A molecular cell biology of lithium. *Biochem Soc Trans* 32:799-802.2004).
- Williamson R, van Aalten L, Mann DM, Platt B, Plattner F, Bedford L, Mayer J, Howlett D, Usardi A, Sutherland C, Cole AR (CRMP2 hyperphosphorylation is characteristic of Alzheimer's disease and not a feature common to other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 27:615-625.2011).

- Windle WF, Chambers WW (Regeneration in the spinal cord of the cat and dog. *J Comp Neurol* 93:241-257.1950).
- Winkler T, Sharma HS, Stalberg E, Badgaiyan RD, Gordh T, Westman J (An L-type calcium channel blocker, nimodipine influences trauma induced spinal cord conduction and axonal injury in the rat. *Acta Neurochir Suppl* 86:425-432.2003).
- Witte H, Neukirchen D, Bradke F (Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180:619-632.2008).
- Woodgett JR, Cohen P (Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochim Biophys Acta* 788:339-347.1984).
- Wrathall JR, Li W, Hudson LD (Myelin gene expression after experimental contusive spinal cord injury. *J Neurosci* 18:8780-8793.1998).
- Xia Y, Rogers JA, Paul KE, Whitesides GM (Unconventional Methods for Fabricating and Patterning Nanostructures. *Chem Rev* 99:1823-1848.1999).
- Xie Y, Jiang X (Microcontact printing. *Methods Mol Biol* 671:239-248.2011).
- Xu NJ, Henkemeyer M (Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nat Neurosci* 12:268-276.2009).
- Yamashita T, Tohyama M (The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6:461-467.2003).
- Yamashita Y, Ono M, Takai T (Inhibitory and stimulatory functions of paired Ig-like receptor (PIR) family in RBL-2H3 cells. *J Immunol* 161:4042-4047.1998).
- Yang YS, Strittmatter SM (The reticulons: a family of proteins with diverse functions. *Genome Biol* 8:234.2007).
- Yick LW, So KF, Cheung PT, Wu WT (Lithium chloride reinforces the regeneration-promoting effect of chondroitinase ABC on rubrospinal neurons after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 21:932-943.2004).
- Yiu G, He Z (Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 7:617-627.2006).
- Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR (Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* 21:75-80.1998).
- Yoon S, Choi J, Haam J, Choe H, Kim D (Reduction of mint-1, mint-2, and APP overexpression in okadaic acid-treated neurons. *Neuroreport* 18:1879-1883.2007).
- Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas SS, Waeber C, Bakowska JC, Breakefield XO, Moskowitz MA (FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5874-5879.2001).
- Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K (GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120:137-149.2005).
- Yu P, Huang L, Zou J, Yu Z, Wang Y, Wang X, Xu L, Liu X, Xu XM, Lu PH (Immunization with recombinant Nogo-66 receptor (NgR) promotes axonal regeneration and recovery of function after spinal cord injury in rats. *Neurobiol Dis* 32:535-542.2008a).
- Yu W, Qiang L, Solowska JM, Karabay A, Korulu S, Baas PW (The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Mol Biol Cell* 19:1485-1498.2008b).
- Yu W, Solowska JM, Qiang L, Karabay A, Baird D, Baas PW (Regulation of microtubule severing by katanin subunits during neuronal development. *J Neurosci* 25:5573-5583.2005).
- Zagrebelsky M, Schweigreiter R, Bandtlow CE, Schwab ME, Korte M (Nogo-A stabilizes the architecture of hippocampal neurons. *J Neurosci* 30:13220-13234.2010).

- Zhang L, Zheng S, Wu H, Wu Y, Liu S, Fan M, Zhang J (Identification of BLYS (B lymphocyte stimulator), a non-myelin-associated protein, as a functional ligand for Nogo-66 receptor. *J Neurosci* 29:6348-6352.2009a).
- Zhang N, Zhong R, Yan H, Jiang Y (Structural features underlying selective inhibition of GSK3beta by dibromocantharelline: implications for rational drug design. *Chem Biol Drug Des* 77:199-205.2011).
- Zhang Z, Ottens AK, Sadasivan S, Kobeissy FH, Fang T, Hayes RL, Wang KK (Calpain-mediated collapsin response mediator protein-1, -2, and -4 proteolysis after neurotoxic and traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 24:460-472.2007).
- Zhang Z, Xu X, Zhang Y, Zhou J, Yu Z, He C (LINGO-1 interacts with WNK1 to regulate nogo-induced inhibition of neurite extension. *J Biol Chem* 284:15717-15728.2009b).
- Zheng B, Atwal J, Ho C, Case L, He XL, Garcia KC, Steward O, Tessier-Lavigne M (Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1205-1210.2005).
- Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O, Tessier-Lavigne M (Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 38:213-224.2003).
- Zheng B, Lee JK, Xie F (Genetic mouse models for studying inhibitors of spinal axon regeneration. *Trends Neurosci* 29:640-646.2006).
- Zhou FQ, Snider WD (Cell biology. GSK-3beta and microtubule assembly in axons. *Science* 308:211-214.2005).
- Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, Wu YH, Snider WD (NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42:897-912.2004).
- Zhou J, Wulfeuhle J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J, Margolick JB, Liotta LA, Petricoin E, 3rd, Zhang Y (Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16158-16163.2007).
- Zurita M, Otero L, Aguayo C, Bonilla C, Ferreira E, Parajon A, Vaquero J (Cell therapy for spinal cord repair: optimization of biologic scaffolds for survival and neural differentiation of human bone marrow stromal cells. *Cytotherapy* 12:522-537.2010).

