



INA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

**IMPLICACIÓN DE LA VÍA NRG-ErbB
EN LA MIELINIZACIÓN DEL SISTEMA
NERVIOSO PERIFÉRICO (SNP),
LA NEUROFIBROMATOSIS Y
EL DESARROLLO DE TUMORES
MALIGNOS DEL SNP.**

Tesis Doctoral

José Antonio Gómez Sánchez

San Juan de Alicante, Octubre 2010

Director de Tesis: Dr. Hugo Cabedo Martí

Agradecimientos

Después de 4 años de alegrías, viajes, congresos y mucho trabajo, me encuentro escribiendo estas líneas de agradecimientos. Intentaré no ser muy extenso, pero será difícil.

En primer lugar dar las gracias a mi director de tesis el Dr. Hugo Cabedo, por confiar en mí para realizar mi tesis doctoral en su laboratorio, y poder encontrar tanta gente con la que he compartido tantos buenos momentos en los últimos 4 años.

A mis padres, mis hermanas y mi “cuñao”, gracias por estar ahí cuando lo he pedido y necesitado.

Mama y Papa gracias por el apoyo incondicional sin miramientos que habéis tenido durante estos 30 años, y por darme la oportunidad de tener siempre lo mejor: vuestro cariño.

Ana y Paula, las dos personas con las que más me he peleado en este mundo, pero siempre las he tenido a mi lado, muchas gracias. Tenemos que “cuadrar” las agendas más a menudo.

Pascual, gracias por aliarte conmigo contra mi hermana :p

A mi familia, abuelos, tíos y primas por estar siempre ahí a pesar de mis ausencias, vosotros sois los que más han notado mi dedicación a la “ciencia” (habéis sentido lo apretado de mi “agenda”).

A mi tío Salva, una de las personas que más ganas tenía de ver esta tesis acabada, en estos momentos seguro que lo tengo a mi lado.

A mis maestras, Christelle y María, sin ellas seguro que esta tesis no se hubiese escrito nunca. Gracias por dejar que vuestro discípulo “okupa” os haya invadido en tantas ocasiones. Sé que tengo un hueco en vuestro corazón, y por supuesto en vuestras casas cuando haga falta.

María, gracias por tus consejos, paciencia, conversaciones y apoyo en todas las situaciones y momentos que hemos vivido juntos, y sobre todo por cuidarme (el discípulo nunca podrá superar a la maestra).

Christelle, gracias por tu amistad y dejarme ir a Paris todas las veces que he podido. Estar contigo, conversar y pasear me da la tranquilidad que necesito durante una larga temporada.

A Carol, Dani, Annika, Rodolfo, Sophie y Sigi, gracias por hacerme pasar esos buenos momentos fuera del laboratorio, y Sophie y Carol por hacerme más agradable el tiempo que hemos coincidido en el laboratorio.

Annika, gracias por darme tus puntos de vista cuando te los he pedido, por ayudarme sin importarte que te quitase tu tiempo. No te preocupes que te falta poco para tenerme de okupa.

Sophie, estos últimos años he echado mucho de menos tu arte en la cocina, y sobre todo tu compañía y la de Sigi fuera del laboratorio.

Carol, gracias por tantos momentos vividos en los que no nos hemos envenenado de milagro, y sobretodo por acordarte siempre de mí.

Dani y Rodolfo, gracias por esos momentos vividos fuera del laboratorio, y por supuesto por vuestra amistad.

A mis actuales compañeras de laboratorio Mary, Cruz, Manue y Clara, gracias por aguantar a “grumpy” durante la elaboración de esta tesis.

Mary, gracias por protegerme como a uno de tus hijos, y sobretodo por tu ayuda incondicional cuando me has visto estresado o preocupado (esta conversación NO me suena).

Clara, gracias por enseñarme a ser un “poco” más multitareas, creo que es difícil que pueda igualarte, aunque lo intentaré.

Manue, gracias por ser una referencia a la que poder admirar, y por ser como eres dentro y fuera del laboratorio.

Cruz, gracias por ayudarme y enseñarme en el laboratorio durante estos años.

A Ana M, Mariajo, Annalú, Eva, Bristol, Hugo, , Víctor, Jan-Albert, Enoch, Karel, y Andrés, gracias por hacerme sentir como uno más de vuestro laboratorio. Por contar conmigo en vuestras comidas y fiestas de becarios. Por hacerme focalizar cuando estaba disperso.

Ana M, gracias por estar cuidándome siempre, y sobretodo asegurándote que el nenico vaya a su hora a por la comida.

Mariajo, gracias por hacer tan entretenido subir a la segunda planta, esa planta sin escuchar la palabra (*) no sería lo mismo.

A Giovanna y Jarmila, muchas gracias por todos esos momentos que hemos pasado juntos en el instituto, pero sobretodo fuera de él.

A todos los amigos que he ido haciendo en el INA durante estos años Ceci, Celia, Maria Letizia, Eva, Sara, Diego, Blanca, Manuel, Almudena, Augusto, Maribel, Cristina, Rosa, Zeus, Giorgia, ... Sin vosotros ir a pedir favores hubiese sido otra cosa, y sobretodo gracias por lo bien que lo he pasado con vosotros fuera del instituto.

A mis amigos Óscar, Rubén, Lourdes, Lorena, Vicente, Raquel, Raúl, Jaime, Magalí, Paloma, Sergi, Miguel, Cristina, Santi, Carmen, Raquel, Nuria, Enrique ... , gracias por los paseos, cenas, caminatas, y por todos esos momentos tan entretenidos y divertidos que hemos disfrutado juntos.

Rubén, Óscar y Mariano, gracias por "sacarme" de pajareo, volveré a hacer uso de mi carnet de anillador, o me lo quitarán. La verdad es que echo de menos esos desayunos a las 6, y los almuerzos criticándonos entre nosotros.

Lourdes, Rubén y Óscar, gracias por estar dispuestos siempre a todo lo que os he pedido, y sin pedíroslo.

Lourdes, celebramos la tesis en el Puig Campana?



Índice

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN	1
1. La mielinización	1
1.1. Propiedades de las fibras mielinizadas	1
1.2. Estructura de las fibras mielinizadas	2
1.3. Ultraestructura y composición de la membrana de mielina	4
2. Regulación de la mielinización en el SNP	7
2.1. Embriología y desarrollo postnatal de los nervios periféricos	7
2.2. El linaje de las células de Schwann	8
2.3. La señalización axón-glia controla el desarrollo de las células de Schwann y la mielinización	11
2.4. NRG1: un gen esencial para el desarrollo del SNP y la mielinización	13
2.4.1. Estructura del gen NRG1	14
2.4.2. NRG1 controla el desarrollo de las células de Schwann y la mielinización	20
2.4.3. La desregulación de la vía NRG1-ErbB como origen de algunas patologías: implicación en el cáncer	24
3. ¿Tiene NRG1 un papel en la regulación de la mielinización del SNC?	25
OBJETIVOS	28

RESULTADOS	29
1. Sobre-expresión neuronal <i>in vivo</i> de la neuregulina tipo III-β humana (hSMDF): generación de ratones <i>NSE-hSMDF</i>	29
1.1. Construcción del plásmido <i>NSE-hSMDF</i>	29
1.2. Microinyección en oocitos y obtención de líneas de ratones transgénicos	30
1.2.1. Evaluación del número de copias integradas mediante PCR cuantitativa (qPCR)	30
1.3. Expresión del transgén en las diferentes líneas de ratones	32
1.3.1. El promotor <i>NSE</i> dirige la expresión del transgén a las neuronas	32
1.3.2. Perfil de expresión temporal del transgén	35
2. Efectos de la sobre-expresión neuronal de la neuregulina III-β en la mielinización del sistema nervioso central	36
2.1. Efectos del transgén sobre los niveles de RNA mensajero para las proteínas de la mielina	36
2.2. Efectos a nivel de proteína	37
2.3. Efectos sobre el grosor de la capa de mielina	38
3. Consecuencias de la sobre-expresión neuronal de la neuregulina III-β en la mielinización del sistema nervioso periférico	40
3.1. La sobre-expresión neuronal de SMDF provoca una activación mantenida de las cascadas de señalización de la MAPK y la PI3K en las células de Schwann del nervio ciático	40
3.2. Efectos del transgén sobre la mielinización	42

3.2.1 La expresión del transgén provoca una dramática caída de los niveles de mRNA que codifican para las proteínas de la mielina	42
3.2.2. Caída de los niveles de proteínas de la mielina en los ratones mutantes	44
3.2.3. Relación entre los niveles de proteínas de mielina y el grosor de la capa de mielina	45
3.3. La sobreactivación de la vía de las neuregulinas desregula el perfil de expresión de los factores de transcripción “maestros” que controlan el desarrollo de las células de Schwann y la mielinización	47
3.4. Los ratones <i>NSE-hSMDF^(+/-)</i> muestran un notable engrosamiento de los nervios y ganglios periféricos	48
3.4.1. El aumento del tamaño de los nervios es consecuencia de un incremento en el número de células de Schwann	48
3.4.1. Estudios en el nervio ciático	49
3.4.1.1. Evolución temporal del diámetro nervioso y número de células durante el desarrollo postnatal	50
3.4.1.2. La hipercelularidad es consecuencia de la expansión de la población de las células de Schwann no mielinizantes (GFAP+)	54
3.4.2. Estudios en el nervio vago	58
3.5. El aumento en la proliferación celular explica la hiperplasia de los nervios periféricos	60
3.6. Desorganización y mielinización de los haces de <i>Remak</i> en los ratones <i>NSE-hSMDF^(+/-)</i>	62

3.6.1. Los axones de los haces de <i>Remak</i> mutantes contactan físicamente unos con otros	63
3.6.2. SMDF instruye la mielinización de los haces de <i>Remak</i>	64
3.6.3. Estudios en el nervio vago	66
3.6.4. La desestructuración de los haces mutantes y su mielinización no afecta a la distribución de sus diámetros	67
3.6.5. Consecuencias de la mielinización de los haces de <i>Remak</i> sobre la velocidad de conducción nerviosa	68
4. Los ratones <i>NSE-hSMDF</i> ^(+/-) desarrollan lesiones similares a los neurofibromas	70
4.1. Acumulación de colágeno extracelular	71
4.1.1. Tinción de Gomori	71
4.1.2. Estudios de microscopía electrónica	72
4.2. Desarrollo de tumores en el sistema nervioso periférico	72
4.2.1. Aspecto macroscópico e histológico del tumor	73
4.2.2. El patrón de expresión génica sugiere que los tumores se originan a partir del linaje de las células de Schwann	73
4.3. ¿Contribuye la sobreactivación de la vía NRG1-ErbB al desarrollo de tumores del SNP en la neurofibromatosis tipo 1? Algunos resultados preliminares	75
DISCUSIÓN	80
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXO	



Abreviaturas

Akt	<i>Serine/Threonine Protein Kinase</i> / Serina/Treonina Proteína Quinasa
ARIA	<i>Acetylcholine Receptor Inducing Activity</i> Factor Inductor del Receptor de Acetilcolina
AP2α	<i>Activating enhancer-binding Protein 2 alpha</i> Proteína activadora-potenciadora de unión 2 alfa
apoE	<i>Apolipoprotein E</i> / Apolipoproteína E
ATP	<i>Adenosin Triphosphate</i> / Trifosfato de Adenosina
BFABP	<i>Brain Fatty Acid Binding Protein</i> Proteína de Unión de Ácidos Grasos del Cerebro
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> / Proteína Morfogenética Ósea
BrdU	<i>5'-Bromo-2'-desoxiUridin</i> / 5'-Bromo-2'-desoxiUridina
Cad19	<i>Cadherin 19</i> / Cadherina 19
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i> Ácido Desoxirribonucleico Complementario
CNPasa	<i>2', 3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase</i> 2', 3'- Nucleótido Cíclico 3'-Fosfodiesterasa
COS7	<i>African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblast cell line</i> Células de Riñón de Mono verde con secuencias de ADN del virus SV-40
CRD	<i>Cystein-Rich Domain</i> / Dominio Rico en Cisteína
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> / Ácido Desoxirribonucleico
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i> / Ganglios Raquídeos
EGF-like	<i>Epidermal Growth Factor like domain</i> Dominio parecido al factor de crecimiento epidérmico
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i> / Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2
GalC	<i>Galactosylceramide C</i> / Galactoceramida C
GAP43	<i>Growth Associated Protein 43kDa</i> Proteína Asociada al Crecimiento, de 43kDa
GFAP	<i>Glial fibrillary Acidic Protein I</i> / Proteína Ácida Fibrilar Glial
GGF	<i>Glial Growth Factor</i> / Factor de Crecimiento Glial
GJA5	<i>Gap Junction Alpha 5</i> / Unión Comunicante Alfa 5
HBEGF	<i>Heparin-Binding EGF-like Growth Factor</i> Factor de Crecimiento semejante a EGF que une Heparina
HER	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor</i> Receptor del Factor Epidérmico Humano
HMGR	<i>3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase</i> 3-Hidroxi-3-Metilglutaril-Coenzima A Reductasa

IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> Factor de Crecimiento parecido al dominio Insulínico
Ig-like	<i>Immunoglobulin-like Domain</i> / Dominio parecido a Inmunoglobulina
iSC	<i>Immature Schwann Cell</i> / Célula de Schwann Inmadura
KO	<i>Knock-out</i> / Gen Interrumpido
MAG	<i>Myelin Associated glycoprotein</i> / Glicoproteína Asociada a la Mielina
MAPK	Mytogen Activated Protein Kinase Proteína Quinasa Activada por Mitógenos
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i> / Proteína Básica de la Mielina
MCF7	<i>Human breast adenocarcinoma cell line</i> Línea de células humanas de Cáncer de Mama
MPNST	<i>Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor</i> Tumor maligno de la vaina del nervio periférico
MOG	<i>Myelin Oligodendrocyte glycoprotein</i> Glicoproteína de la Mielina del Oligodendrocito
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> / Ácido Ribonucleico Mensajero
mSC	<i>Myelinating Schwann Cell</i> / Célula de Schwann Mielinizante
NAB	<i>Nucleic Acid-Binding Protein</i> / Proteína de Anclaje de Ácidos Nucleicos
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> / Molécula de Adhesión Neural
NDF	<i>Neu Differentiation Factor</i> / Factor de Diferenciación Neu
NF1	<i>Neurofibromatosis type 1</i> / Neurofibromatosis tipo 1
NFkB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i> / Factor Nuclear Kappa B
nmSC	<i>Non-Myelinating Schwann Cell</i> / Célula de Schwann No Mielinizante
NRG	<i>Neuregulin</i> / Neuregulina
NSE	<i>Neuron Specific Enolase</i> / Enolasa Neuronal Especifica
NTB/BCIP	<i>Nitrotetrazolium Blue 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate</i> Azul Nitro-tetrazolio 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato
Oct-6	<i>Octamer Transcription Factor 6</i> / Factor de Transcripción Octámero 6
OPC	<i>Oligodendrocyte Precursor Cell</i> Célula Precursora de Oligodendrocitos
P0	<i>Myelin Protein Zero</i> / Proteína Cero de la Mielina
P2	<i>Myelin Protein 2</i> / Proteína de la Mielina 2
P75NTR	<i>p75 Neurotrophin Receptor</i> / Receptor Neurotrofinas p75
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF-BB	<i>Platelet Derived Growth Factor BB</i> Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas BB

pH3	<i>Serine-10-phosphorylated Histone H3</i> Histona H3 fosforilada en la serina 10
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase / Fosfoinositol-3-Quinasa</i>
PLP	<i>Proteolipid Protein / Proteína Proteolípica de la Mielina</i>
qPCR	<i>Quantitative-Real Time PCR / PCR Cuantitativa en Tiempo Real</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid / Ácido Ribonucleico</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription PCR / PCR en Transcripción Reversa</i>
SC	<i>Schwann Cell / Célula de Schwann</i>
SCp	<i>Schwann Cell Precursor / Célula de Schwann Precursora</i>
S MDF	<i>Sensory And Motor Neuron Derived Factor</i> Factor Derivado de las Neuronas Sensoriales y Motoras
SNC	<i>Central Nervous System / Sistema Nervioso Central</i>
SNP	<i>Peripheral Nervous System / Sistema Nervioso Periférico</i>
SREBP2	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein 2</i> Proteína de Anclaje del Elemento Regulador de Esteroles 2
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i> Factor de Crecimiento y Transformación de tipo β
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin / Aglutinina de Germen de Trigo</i>





Introducción

1. La mielinización.

El sistema nervioso es responsable de la transmisión de señales entre los distintos tejidos para coordinar y asegurar el correcto funcionamiento de los organismos pluricelulares. Las señales neuronales se propagan desde el soma neuronal hasta el tejido diana, a través de los axones, que pueden estar recubiertos o no por mielina. La mielina, llamada así por Virchow en 1854, es una membrana multilamelar formada por la extensión de la membrana plasmática de las células gliales del sistema nervioso, que se enrolla sobre el axón. Los axones de las neuronas envueltos por mielina transmiten de forma más rápida y eficiente los impulsos nerviosos. Además de aumentar la velocidad de conducción del impulso nervioso, la mielina permite un considerable ahorro energético y de espacio a los organismos que la producen (Garbay, Heape et al. 2000).

El sistema nervioso de los vertebrados está dividido en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). En el SNC, son los oligodendrocitos los que mielinizan los axones. Cada uno de ellos puede interactuar con múltiples axones, mielinizándolos simultáneamente. En el SNP esta función la desarrollan las células de Schwann, un tipo de glia capaz de envolver y mielinizar a tan solo un axón por célula (figura I1a) (Jessen y Mirsky 2005). A pesar de la relevancia de la mielinización en los vertebrados, no todos los axones están rodeados por una capa de mielina. En el sistema nervioso periférico los axones de pequeño calibre no se mielinizan. En su lugar las células de Schwann los agrupan en haces, envolviéndolos y separando unos de otros con su citoplasma, conformando unas estructuras denominadas haces de Remak (en inglés *Remak bundles*) (Murinson y Griffin 2004).

1.1. Propiedades de las fibras mielinizadas.

Los oligodendrocitos y las células de Schwann son embriológicamente y morfológicamente distintas, reflejando más de 300 millones de años de evolución glial paralela. La asociación entre los axones y células gliales, que les dan soporte rodeándolos, aparece desde los primeros momentos de la evolución, encontrándose esta asociación (neurona-glia) ya en la mayoría de los invertebrados (Schweigreiter, Roots et al. 2006). Sin embargo, excepto en

los agnatos (lampreas y mixinos) la mielina tal como la conocemos en los mamíferos aparece por primera vez en los vertebrados. Aunque la mielina es una estructura típica de los vertebrados, algunos invertebrados como los anélidos, crustáceos, moluscos y artrópodos, desarrollan una forma de recubrimiento axonal por la glia que cumple una función semejante. Esto es probablemente un caso de convergencia evolutiva (Baumann y Pham-Dinh 2001; Klambt, Hummel et al. 2001; Schweigreiter, Roots et al. 2006)

Los axones mielinizados conducen la señal nerviosa aproximadamente diez veces más rápido que los no mielinizados. Para conseguir la misma velocidad que un axón mielinizado, un axón no mielinizado debería ser cuarenta veces más ancho y emplear cinco mil veces más energía (Garbay, Heape et al. 2000). Junto con la función de aumentar la velocidad de conducción, la mielina está también implicada en la regulación del transporte axonal (Edgar, McLaughlin et al. 2004), el mantenimiento de la integridad axonal (Edgar y Garbern 2004) y la composición iónica y la regulación del volumen axonal (Laule, Vavasour et al. 2007).

Las vainas de mielina son fundamentales para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. La pérdida de la capa de mielina o su degradación tiene un efecto devastador en el individuo. En el sistema nervioso periférico causa enfermedades tales como el síndrome de Guillain-Barré o la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Por su parte, en el sistema nervioso central, la pérdida de mielina es la responsable de los síntomas de enfermedades como la esclerosis múltiple y las leucodistrofias (Taveggia, Feltri et al. 2010).

1.2. Estructura de las fibras mielinizadas.

En general, a lo largo del eje longitudinal de una fibra mielinizada podemos distinguir diferentes estructuras como son el nodo de Ranvier, el paranodo, el yuxtaparanodo y el internodo, siendo este último la zona realmente recubierta por la membrana de mielina (figura I1).

El nodo de Ranvier es una región de 1-5 μ m de membrana del axón (axolema) localizada entre dos vainas de mielina adyacentes. Los nodos están separados unas 100 veces el diámetro del axón. Los canales de sodio se

concentran en una alta densidad en el nodo, y son esenciales para la generación del potencial de acción durante la conducción saltatoria a lo largo del axón (Poliak y Peles 2003). Los canales de sodio son activados por la despolarización de la membrana axonal y permiten una entrada masiva de iones sodio en el axón causando una nueva ola de despolarización. Esta nueva ola se transporta pasivamente a lo largo del segmento internodal hasta el siguiente nodo de Ranvier. Debido a las propiedades aislantes de la mielina, dispuesta de forma discontinua en el axón, el potencial de acción se desplaza saltando de un nodo de Ranvier a otro, por lo que se le denomina conducción saltatoria (Nave y Trapp 2008).

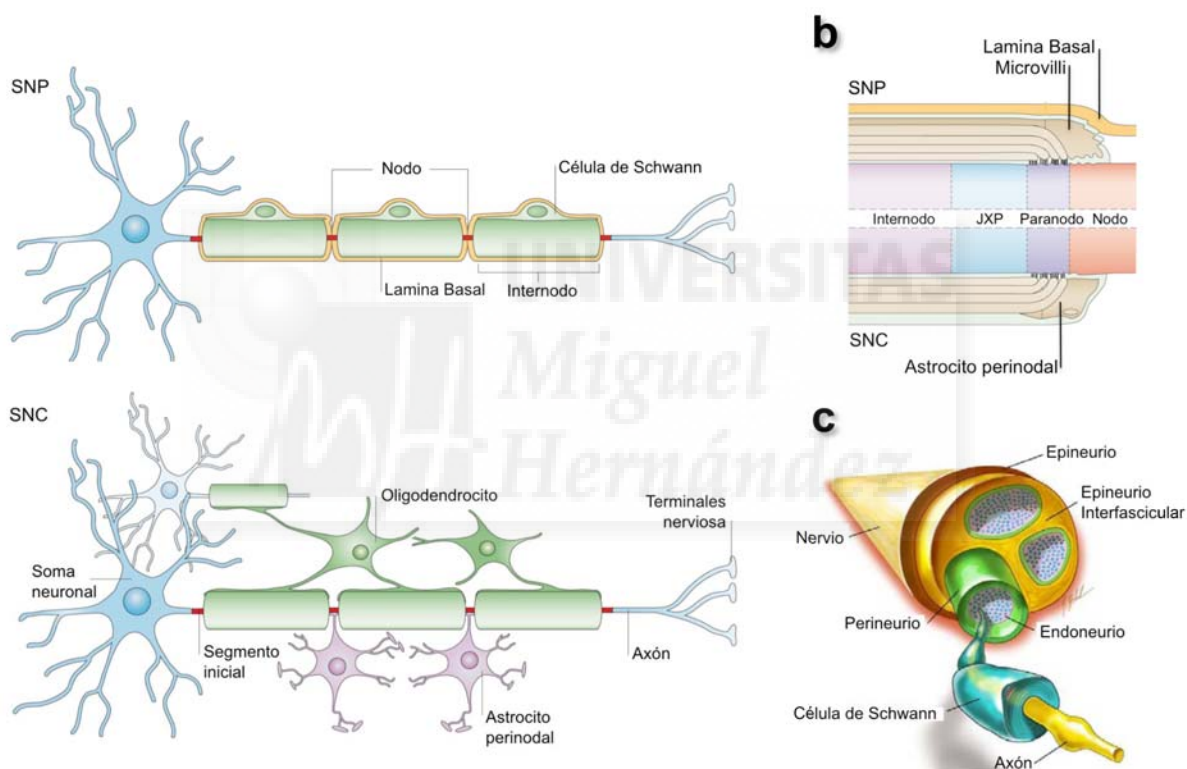


Figura 11: Estructura de los axones mielinizados. **a.** Las células gliales mielinizantes, son células de Schwann en el SNP o oligodendrocitos en el SNC. La mielina recubre los axones a intervalos (internodos), dejando un espacio sin recubrir – el nodo de Ranvier. Los oligodendrocitos pueden mielinizar diferentes axones y varios internodos por axón, mientras que las células de Schwann sólo mielinizan un único internodo de un solo axón. **b.** Esquema de un axón mielinizado cortado longitudinalmente, donde están marcadas las regiones del nodo, paranodo, juxtaparanodo e internodo. **c.** Estructura del nervio periférico. El epineurio es la capa más externa. Recubre al perineurio quien a su vez cubre el endoneurio compuesto de los axones, células de Schwann y fibroblastos principalmente. (Imagen modificada de Poliak y Peles, 2003).

Los nodos en el SNP y SNC presentan características estructurales similares, aunque existen algunas notables diferencias. En los nervios periféricos mielinizados los axones están recubiertos por una lamina basal sintetizada por las células de Schwann mielinizantes. Además en el SNP, el contacto entre los axones y las células de Schwann en los nodos de Ranvier está establecido por el *microvilli*. Los *microvilli* proyectan sobre el nodo en la región del paranodo, y proporcionan una señal para la formación y localización de los nodos del SNP. El espacio perinodal que contiene el *microvilli* (espacio entre la lámina basal y axolema) está lleno de una matriz extracelular filamentosa (figura 11b). En el SNC no hay lamina basal y los nodos están en contacto con los astrocitos perinodales que participan en la formación de los nodos (llamados en inglés *synantocytes*) (Poliak y Peles 2003).

1.3. Ultraestructura y composición de la membrana de mielina.

Bioquímicamente la mielina se diferencia de la membrana plasmática de otras células por su alta relación lípido-proteína. Mientras que en una membrana plasmática típica el 70% del peso es proteína y sólo el 30% corresponde a lípidos, en la mielina los lípidos forman el 70-80% del peso seco y las proteínas tan sólo entre el 20 y el 30% (Garbay, Heape et al. 2000).

Aunque la función de la mielina en el sistema nervioso central y periférico es la misma, su composición molecular varía, lo que se traduce en algunos cambios en las propiedades bioquímicas, estructurales y funcionales, que diferencian la mielinización del SNC y el SNP.

El trabajo de esta tesis se ha centrado principalmente en el SNP por lo que es importante describir las características más notorias de la composición lipídica y proteica de la mielina en el SNP, nombrando alguna de las diferencias con el SNC.

Como ya he indicado con anterioridad, los lípidos que componen la mielina del SNP suponen el 70-80% del peso seco. Estos lípidos son fundamentalmente colesterol, fosfolípidos y esfingolípidos. El colesterol representa el 20-30% del total de lípidos de la mielina del SNP (Garbay, Heape et al. 2000). Se ha sugerido que el colesterol tiene un papel en la estabilización y compactación de la mielina (Nussbaum, Neskovic et al. 1969; Detering y

Wells 1976). Los fosfolípidos representan el 50-60% del total de los lípidos de la mielina, siendo la fosfatidiletanolamina y esfingomielina los lípidos más abundantes de esta clase (Garbay, Heape et al. 2000).

Las proteínas suponen el 20-30% del peso seco de la mielina del SNP. De éstas al menos el 60% son glicoproteínas y otro 20-30% son proteínas básicas. La proteína cero (P0), que es la proteína más abundante, es una glicoproteína integral de membrana, específica de las células de Schwann mielinizantes. Supone más del 50% del total de las proteínas. La función de P0 es mantener la compactación de la capa de mielina al ser una proteína de adhesión. La otra proteína mayoritaria es la proteína básica de la mielina (MBP del inglés *myelin basic protein*), que corresponde al 5-15% del total de proteínas. Es una proteína periférica de membrana, que se une a los lípidos cargados negativamente y está localizada en la superficie citosólica (figura I2). Al igual que P0 está implicada en la compactación de la mielina. En contraste, en el SNC las proteínas mayoritarias son MBP y PLP/DM20, que corresponden al 80% del total de proteínas presentes en la mielina.

Otras proteínas que se encuentran en cantidades significativas en la mielina del SNP son la proteína básica P2 (que representa el 1-10%) y la proteína de mielina periférica 22 (PMP22), una glicoproteína que representa el 2-5%. Otras proteínas como la periaxina, la 2',3'-nucleotido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa) y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG), se localizan en los compartimentos no compactados de la mielina. Todas estas proteínas también se encuentran en el SNC, excepto la periaxina. La periaxina, supone el 5% del total de las proteínas. La CNPasa representa el 0,5% en el SNP y un 4% en el SNC, y su función es mediar en la interacción entre el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática (Garbay, Heape et al. 2000). La MAG se encuentra en un 0.1% en el SNP y 1% en el SNC, y en ambos sistemas tiene una distribución diferente (en el SNC se localiza exclusivamente en la región periaxonal). En la mielina del SNC existen varias proteínas exclusivas, como lo es por ejemplo la glicoproteína básica asociada a la mielina de oligodendrocitos (MOG).

La mielina que recubre el internodo axonal se puede dividir en dos dominios, la mielina compacta y la mielina no compacta. Cada dominio

contiene sus respectivas proteínas particulares (Scherer y Arroyo 2002). La mielina compacta forma la mayor parte de la vaina de la mielina. Su organización es producida por la compactación de múltiples capas de membrana plasmática de la célula de Schwann enrolladas concéntricamente alrededor del axón, dejando estrechos canales de citoplasma de la propia célula de Schwann sin compactar. Estas estructuras se denominan cisuras de Schmidt-Lanterman (Salzer 2003), y sirven para el transporte de proteínas, nutrientes y moléculas entre los compartimentos citoplasmáticos en el internodo, ya que poseen uniones comunicantes (o en inglés *gap junctions*). Estas cisuras son importantes para la integridad a largo plazo de la capa de mielina (Scherer y Arroyo 2002).

Con la ayuda de la microscopía electrónica de transmisión es posible apreciar en la mielina una secuencia de líneas claras y oscuras cada 12nm (figura I2). En torno a cada unidad repetitiva está la línea densa mayor, que se forma por la aposición de las superficies citoplasmáticas de la membrana plasmática de la célula de Schwann. Situado entre las líneas densas mayores y formado por la aposición de las caras externas de la membrana plasmática de la célula de Schwann se encuentra la línea doble intraperiódica o línea densa menor.

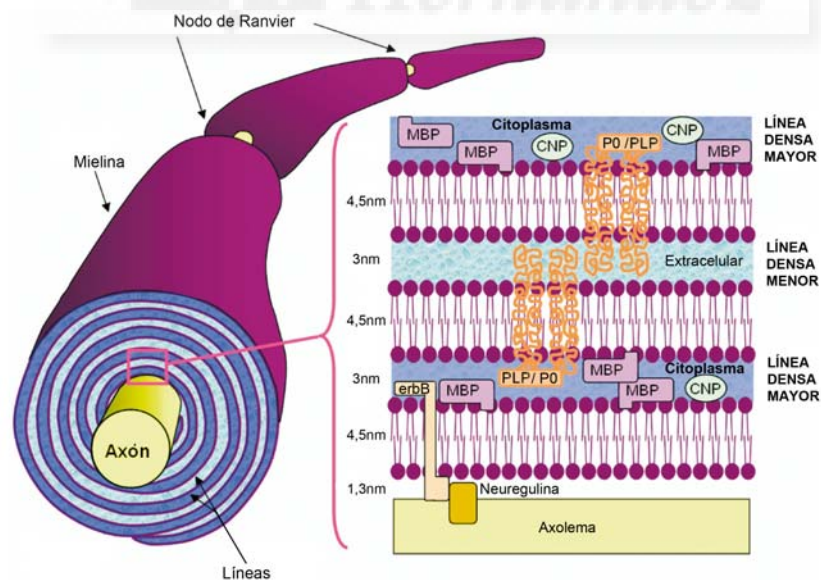


Figura I2: Esquema de las diferentes líneas que pueden ser observadas en la vaina de mielina, la línea densa mayor y la línea densa menor. Las capas se han esquematizado con las proteínas mayoritarias en cada capa (proteínas de anclaje P0 (SNP) o PLP (SNC), MBP y CNPasa), y las distancias existentes entre las diferentes capas (Imagen modificada de Laule, Vavasour et al. 2007).

2. Regulación de la mielinización en el SNP.

El desarrollo de los nervios periféricos de los vertebrados conlleva interacciones celulares complejas entre neuronas, células gliales y células mesenquimales. Parte de estas interacciones ocurren entre neuronas y células de Schwann y llevan a la formación de la mielina. Para ello las células de Schwann producen una hoja de membrana plasmática especial (la mielina) que se enrolla varias veces y de forma muy compacta alrededor del axón (Webster 1971; Garbay, Heape et al. 2000).

2.1. Embriología y desarrollo postnatal de los nervios periféricos.

Los nervios periféricos están compuestos por tres tipos de tejidos distintos: el epineurio, el perineurio y el endoneurio (Figura 11c). El epineurio se encuentra en la parte más externa del nervio y recubre al perineurio que es fino y laminar. El perineurio, a su vez cubre el endoneurio que está compuesto por los axones, fibroblastos y las células de Schwann. Estas últimas son las células más abundantes del endoneurio y proceden de la cresta neural mediante un proceso de diferenciación que conlleva varios pasos.

El proceso de diferenciación y especificación glial desde las células de la cresta neural a células de Schwann (SC) ocurre en estados embrionarios tempranos. En los nervios periféricos, la generación de las células de Schwann es un proceso prolongado que implica dos estados transicionales durante la etapa embrionaria, y una última transición después del nacimiento. La primera transición es de célula de la cresta neural a célula de Schwann precursora (SCp), la segunda transición embrionaria es de célula de Schwann precursora a célula de Schwann inmadura (iSC). La última transición es la diferenciación de células de Schwann inmaduras a células de Schwann mielinizante (mSC) y célula no mielinizante (nmSC) que ocurre después del nacimiento (figura 13) (Jessen, Brennan et al. 1994; Dong, Brennan et al. 1995; Woodhoo y Sommer 2008)

La transición de SCp a iSC coincide con el mayor cambio en la arquitectura de los nervios periféricos durante el desarrollo del nervio. Las SCp están dispuestas en la periferia de los nervios en formación, y están rodeando grandes paquetes de axones de pequeño calibre y diámetro uniforme. En estos

nervios embrionarios no existe todavía matriz extracelular, tejido conectivo ni vasos sanguíneos, que se encuentran la gran mayoría en la periferia del nervio en formación (Jessen y Mirsky 2005; Mirsky, Woodhoo et al. 2008).

Antes del nacimiento los nervios están formados por irregulares grupos de axones e iSC. Estas iSC extienden procesos cada vez más dentro de los haces de axones, formando estructuras conocidas como “familias de células de Schwann”, rodeadas por espacios con tejido conectivo y vasos sanguíneos. A partir de ese momento, las células de Schwann seleccionan los axones de mayor diámetro estableciendo con ellos una relación 1:1, en un proceso conocido como “*radial sorting*” (Jessen y Mirsky 2005; Mirsky, Woodhoo et al. 2008). Sólo los axones con un diámetro superior a 0,8 micras van a interactuar con las células de Schwann y van a ser mielinizados (Friede y Samorajski 1967; Friede 1972).

Durante mucho tiempo se pensó que el diámetro era el punto crítico para decidir si un axón iba a ser o no mielinizado determinando este además el grosor de la vaina de mielina (Friede y Bischhausen 1982; Friede 1986; Fraher, O'Leary et al. 1990). Sin embargo, el trabajo de Elder et al. demostró que el grosor de la vaina de mielina no depende tanto del diámetro de axón, sino más bien de las señales que las células de Schwann son capaces de detectar sobre el axón (Elder, Friedrich et al. 2001). Cuando estos autores disminuyeron el diámetro del axón (aproximadamente en un 30%) mediante la generación de un ratón mutante para los neurofilamentos, observaron que la vaina de mielina era anormalmente más gruesa que la que envolvía a un axón del mismo diámetro en un ratón salvaje. Más tarde, dos grupos distintos demostraron por separado que la neuregulina 1 de tipo III es esta señal axonal de la cual depende el grosor de la vaina de mielina (Michailov, Sereda et al. 2004; Taveggia, Zanazzi et al. 2005).

2.2. El linaje de las células de Schwann.

En el ratón, las células de la cresta neural se diferencian en SCp entre los días 12 y 13 del desarrollo embrionario (E12-E13). Entre el día 15 de desarrollo embrionario (E15) y el nacimiento, estas SCp experimentan ciertos cambios fenotípicos y se convierten en iSC (Mirsky, Jessen et al. 2002; Jessen y Mirsky 2005). Durante la primera semana de vida, una parte de estas células

iSC salen del ciclo celular, dando lugar a las mSC que mielinizan y sintetizan una lámina basal alrededor de los axones (Zorick y Lemke 1996). Otra parte de las iSC se diferencian nmSC, las cuales envuelven varios axones de menor diámetro en los haces de Remak (*Remak bundles*). Las nmSC envuelven y separan los axones de pequeño calibre pero no forman nunca una capa de mielina (Jessen y Mirsky 2002; Jessen y Mirsky 2005; Mirsky, Woodhoo et al. 2008).

Durante los diferentes estadios de desarrollo, las células de Schwann expresan marcadores moleculares, que pueden ser compartidos con otros tipos celulares o ser exclusivos de este tipo celular (figura I3). Así las células de la cresta neural se pueden caracterizar por la expresión de los marcadores erbB3, Sox10, L1, P75NTR, N-cadherina, integrina $\alpha 4$ y AP2 α (Jessen y Mirsky 2005). También se caracterizan por estar asociadas a la matriz extracelular a través de la cual migran. La transición de célula de la cresta neural a SCp está mediado por el factor de transcripción Sox10, el cual controla la expresión de erbB3. En ausencia de este receptor se produce un defecto en la diferenciación hacia el linaje de las células de Schwann (Britsch, Goerich et al. 2001). Además esta transición de célula de la cresta neural a célula de Schwann también puede ser bloqueada por la expresión de proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) (Shah, Groves et al. 1996).

Las SCp están asociadas a grandes grupos de axones y su supervivencia es independiente del contacto con la matriz extracelular. Las células precursoras expresan los mismos marcadores que las células de la cresta neural, pero además (y de manera exclusiva durante este estadio) expresan la cadherina 19. Junto con esta proteína también expresan otros marcadores que no están presentes en las células de la cresta neural como son BFABP, P0, desert hedgehog (DHH), PLP, PMP22 y GAP43 (Mirsky, Woodhoo et al. 2008; Woodhoo y Sommer 2008).

La transición de SCp a iSC se produce en un momento importante del desarrollo de los nervios periféricos. Esta transición está favorecida por la acción de la NRG1, FGF2 y Notch, que aceleran este proceso, mientras que AP2 α y las endotelinas tienen el efecto contrario retrasando la transición. Las iSC están asociadas a los axones pero en esta etapa, las propias células de

Schwann secretan un cóctel de factores de supervivencia (IGF, NT-3 y PDGF-BB) que puede actuar de manera autocrina, dotando a las células de la capacidad de sobrevivir sin el contacto con los axones (Meier, Parmantier et al. 1999). Las células de Schwann, a este nivel expresan como nuevos marcadores GFAP, S100, Oct-6 y O4 (Jessen y Mirsky 2005; Woodhoo y Sommer 2008).

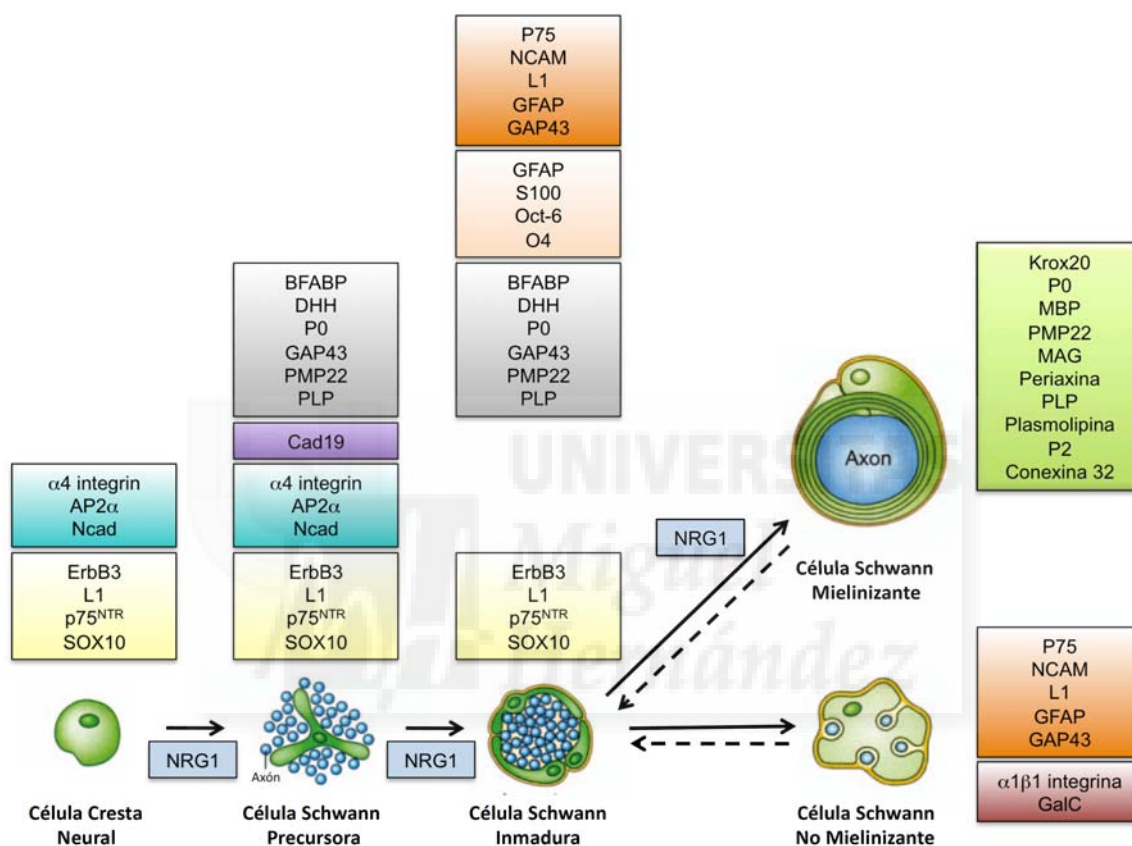


Figura I3: El linaje de las células de Schwann, los marcadores presentes en cada tipo celular, y las transiciones reguladas por las NRG1. (Imagen modificada de Jessen y Mirsky 2005 y Mirsky, Woodhoo et al, 2008)

Después del nacimiento se producen cambios en las iSC que las hacen diferenciarse en dos tipos celulares: las células de Schwann mielinizantes (mSC), que se asocian con los axones de mayor diámetro, y las células de Schwann no mielinizantes (nmSC), que rodean los axones de pequeño diámetro. Las mSC se caracterizan por la expresión de los marcadores: Krox20, MAG, P0, MBP, PMP22 y plasmolipina, entre otros. También se produce una bajada en la síntesis de las moléculas que caracterizan las iSC,

como son L1, NCAM y p75NTR. En el caso de las nmSC muchos de los marcadores de las iSC mantienen su expresión, junto al menos dos moléculas características, no presentes en las iSC, como son la $\alpha 1\beta 1$ integrina y el GalC (Jessen y Mirsky 2002; Jessen y Mirsky 2005; Mirsky, Woodhoo et al. 2008).

Existen reguladores positivos y negativos de la mielinización, que inducen la diferenciación a SC mielinizante o la desdiferenciación a célula inmadura desde el estado mielinizante. La mielinización está promovida por los factores de transcripción Krox20, Oct-6 y las proteínas NAB y BRN2. Sin embargo, c-Jun, Notch, Pax3 y Sox2 promueven la desdiferenciación e inhiben la mielinización (Mirsky, Woodhoo et al. 2008).

2.3. La señalización axón-glia controla el desarrollo de las células de Schwann y la mielinización.

Las células gliales y las neuronas se envían señales de manera recíproca, que garantizan la correcta formación y funcionamiento del sistema nervioso. Las interacciones neurona-glia regulan muchas de las etapas del desarrollo del sistema nervioso. Por ejemplo, la guía axonal se regula mediante señales atractivas y repulsivas emitidas por las células de la glia.

De la misma manera, muchas de las etapas del desarrollo de las células de Schwann dependen de señales asociadas a los axones. Así, para convertirse en células de Schwann, las células de la cresta neural deben primero contactar con los axones en crecimiento formando los nervios embrionarios. La diferenciación de las células de la cresta neural en SCp está regulada por varios factores. Existe un balance entre factores inhibidores como BMP2 y 4 (proteína morfogenética ósea) y factores activadores como Notch y las neuregulinas. Las BMP2 y 4 inhiben la diferenciación glial, favoreciendo la diferenciación de las células de la cresta a neuronas (Shah, Groves et al. 1996). Estudios *in vitro* han sugerido que Notch y las neuregulinas (NRG1) favorecen la gliogénesis de manera indirecta, inhibiendo la diferenciación de las células de la cresta en neuronas (Shah, Marchionni et al. 1994; Morrison, Perez et al. 2000). Sin embargo, no está claro si *in vivo* las neuregulinas realmente inhiben la neurogénesis, ya que en los mutantes de neuregulinas o de sus receptores no se observa un aumento en el número de neuronas

(Garratt, Britsch et al. 2000).

Numerosas moléculas específicas median en las interacciones de los axones con las células de Schwann, éstas incluyen MAG (Yin, Crawford et al. 1998), p75 (Cosgaya, Chan et al. 2002), IGF1 (Syroid, Zorick et al. 1999), integrinas (Feltri, Graus Porta et al. 2002), y TGF- β (Guenard, Rosenbaum et al. 1995). En los últimos años se ha descrito como las neuregulinas y sus receptores juegan un papel importante en las interacciones axón-célula de Schwann en muchas etapas de su desarrollo. Muchos estudios *in vitro* han demostrado que las neuregulinas desarrollan funciones importantes en muchos aspectos del desarrollo de las células de Schwann (Jessen y Mirsky 2005). La NRG1, por ejemplo, presenta diversos efectos sobre las células de Schwann: puede inducir la diferenciación de las células de la cresta neural a células de Schwann (Shah, Marchionni et al. 1994), la maduración de los SCp (Syroid, Maycox et al. 1996), su movilidad y migración (Mahanthappa, Anton et al. 1996) y su proliferación en cultivo (Marchionni, Goodearl et al. 1993). La NRG1 también regula propiedades fisiológicas de las células de Schwann al inducir la expresión de canales de sodio (Wilson y Chiu 1993), e incrementa la comunicación entre las células de Schwann aumentando el número de *gap junction*.

Una característica primordial de los precursores de las SCp es su gran dependencia de las señales axonales para su supervivencia. Se ha demostrado tanto *in vitro* (Jessen, Brennan et al. 1994; Dong, Sinanan et al. 1999) como mediante el uso de ratones transgénicos (Meyer y Birchmeier 1995; Riethmacher, Sonnenberg-Riethmacher et al. 1997), que las neuregulinas, vía sus receptores erbB2 y erbB3, suministran en gran medida estas señales de supervivencia. Durante su desarrollo, los precursores de las células de Schwann sufren un proceso de apoptosis que regula su número. Grinspan y colaboradores, sugieren que los SCp compiten por las neuregulinas y que el número de células que sobreviven depende de la cantidad de neuregulinas axonales disponibles (Grinspan, Marchionni et al. 1996). Mientras los SCp son dependientes de señales axonales, las iSC son capaces de sobrevivir por sí mismas en virtud de un mecanismo autocrino. Esta vía autocrina de supervivencia no parece ser dependiente de las neuregulinas si

no más bien de otros factores como PDGF-BB, NT3 e IGF-2 (Meier, Parmantier et al. 1999).

En la formación de las células de Schwann participan diversos factores de transcripción regulados por el contacto axón-glia, que dirigen las diferentes etapas del desarrollo de este linaje, entre los que destacan tres factores de transcripción principales o “maestros”: Krox20, Oct-6 y Sox10. Estudios con ratones *knock-out* para los genes de estos factores maestros han demostrado graves alteraciones en la mielinización: ausencia de mielina cuando Krox20 es eliminado (Topilko, Levi et al. 1997), un severo déficit en el número de células de Schwann al quitar Sox10 (Topilko, Schneider-Maunoury et al. 1994; Herbarth, Pingault et al. 1998) o severos retrasos en la mielinización cuando Oct-6 es eliminado del genoma (Bermingham, Scherer et al. 1996).

2.4. NRG1: un gen esencial para el desarrollo del SNP y la mielinización.

Las neuregulinas (NRG) son proteínas de señalización que median en las interacciones célula-célula del sistema nervioso, el corazón, los pulmones y otros órganos. Numerosos estudios sugieren que las neuregulinas son importantes mediadores en el desarrollo y mantenimiento del SNP (Fischbach y Rosen 1997; Jessen y Mirsky 1999; Mirsky, Jessen et al. 2002; Falls 2003).

Esta familia de proteínas fue identificada por cuatro grupos de investigación distintos. Dos de los grupos buscaban un activador para el oncogén erbB2, que favorece el desarrollo y progresión de ciertos tumores. En el año 1990, uno de ellos aisló, en el medio de cultivo de líneas celulares de cáncer de mama, un factor de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), capaz de promover la fosforilación de erbB2, en células que no expresaban EGFR (el receptor de EGF). Resultados semejantes fueron obtenidos por un segundo grupo, quienes fueron capaces de purificar de líneas celulares de carcinoma de mama, la Heregulina- α (Lupu, Colomer et al. 1990; Holmes, Sliwkowski et al. 1992; Peles, Bacus et al. 1992; Wen, Peles et al. 1992).

Simultáneamente, un tercer grupo trataba de identificar un factor capaz de estimular la síntesis de los receptores de acetilcolina en los músculos: estos

purificaron y describieron ARIA (del inglés *Acetylcholine Receptor Inducing Activity*) (Jessell, Siegel et al. 1979; Corfas, Falls et al. 1993; Falls, Rosen et al. 1993). El último grupo se interesaba por un factor que favorecía la proliferación de las células de Schwann, descubriendo el GGF (*Glial Growth Factor*) (Raff, Abney et al. 1978; Brockes, Lemke et al. 1980; Goodearl, Davis et al. 1993; Marchionni, Goodearl et al. 1993). En la actualidad, sabemos que todas estas proteínas están codificadas por un mismo gen que se denomina neuregulina 1 (NRG1), y que por procesamiento alternativo de su RNA mensajero y uso de distintos promotores, da lugar a más de 16 isoformas (Falls 2003; Falls 2003; Breuleux 2007).

Después del descubrimiento del gen NRG1, se encontró que existían otros tres genes que codifican proteínas similares: neuregulina 2 (Busfield, Michnick et al. 1997; Carraway, Weber et al. 1997; Chang, Riese et al. 1997; Higashiyama, Horikawa et al. 1997), neuregulina 3 (Zhang, Sliwkowski et al. 1997; Carteron, Ferrer-Montiel et al. 2006) y neuregulina 4 (Harari, Tzahar et al. 1999).

2.4.1. Estructura del gen NRG1.

El gen humano de la neuregulina 1 (figura I4) se localiza en el cromosoma 8p12-p21 (Orr-Urtreger et al., 1993) mientras que el gen en ratones (y ratas) se encuentra en el cromosoma 8A3. Este gen está completamente secuenciado en ambas especies (Steinthorsdottir, Stefansson et al. 2004) y presenta un tamaño de 800 kilobases en el ratón y 1,5 megabases en el humano.

El gen presenta una estructura compleja, dando lugar a más de 16 isoformas distintas de proteínas por procesamiento alternativo del RNA mensajero o/y uso de promotores distintos (Falls 2003). Atendiendo a diferencias en la estructura primaria, las diferentes isoformas se pueden clasificar en tres tipos (I, II y III) (Falls 2003). Además de los tres exones de inicio ya conocidos para las distintas isoformas de la neuregulina 1, Steinthorsdottir y colaboradores identificaron seis nuevos exones con un posible codón de inicio, localizados en la parte 5' del gen humano (Steinthorsdottir, Stefansson et al. 2004). De estos nuevos exones, tres pueden

dar lugar a nuevas proteínas que los autores del trabajo clasifican de tipo IV a tipo VI. Estas tres nuevas isoformas tienen sus homólogos en ratones (Steinthorsdottir, Stefansson et al. 2004). Sin embargo, aunque estos homólogos murinos presentan una pauta de lectura abierta (ORF), carecen de la metionina necesaria para iniciar la transcripción. Esto hace que sea muy poco probable que estas isoformas se expresen en los ratones.

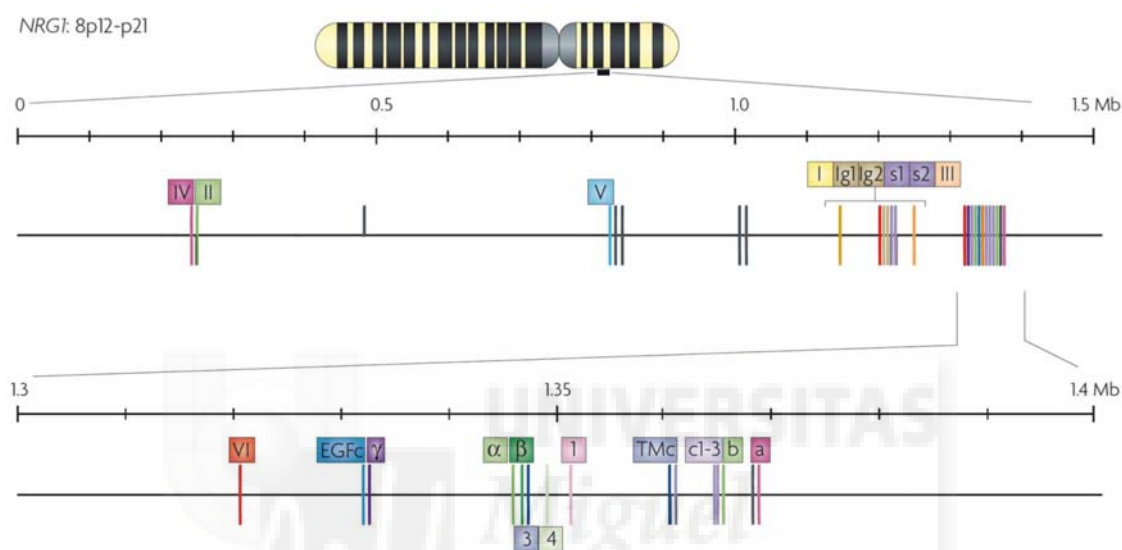


Figura 14: Estructura del gen *NRG1*. El gen *NRG1* está localizado en una región de DNA de 1,5Mb, en el cromosoma 8p12-8p21. Los números romanos indican el exón que especifica para cada tipo de neuregulina. El resto de exones coloreados indican los dominios individuales de la NRG1 (figura modificada de Mei y Xiong, 2008).

Como ya he adelantado, las diferentes isoformas de NRG1 son consecuencia del uso de diferentes promotores situados en la región 5' del gen y al procesamiento alternativo de su RNA mensajero (Falls 2003; Steinthorsdottir, Stefansson et al. 2004). Todas las combinaciones posibles se encuentran representadas en la figura 15. Las isoformas se clasifican en seis grupos, aunque hay tres grupos principales. Estos últimos se basan en las diferencias estructurales (y funcionales) de su región N-terminal.

Todas las isoformas comparten un dominio semejante al EGF (EGF-like) que es capaz de unirse a los receptores erbB y activarlos. Las isoformas de tipo I presentan un dominio semejante a las inmunoglobulinas (*Ig-like*) seguido o no de una región espaciadora, que contiene una secuencia con múltiples

sitios de glicosilación, que lo separa del dominio *EGF-like*. Las isoformas de tipo II tienen el dominio de unión *Ig-like* precedido por un dominio *kringle* (bucle triple estabilizado mediante puentes disulfuros). Estas neuregulinas no presentan la secuencia susceptible de sufrir glicosilación entre el *Ig-like* y el *EGF-like*. Las isoformas de tipo III difieren de los dos otros tipos por presentar un dominio rico en cisteína (CRD) y carecer de los otros dominios nombrados.

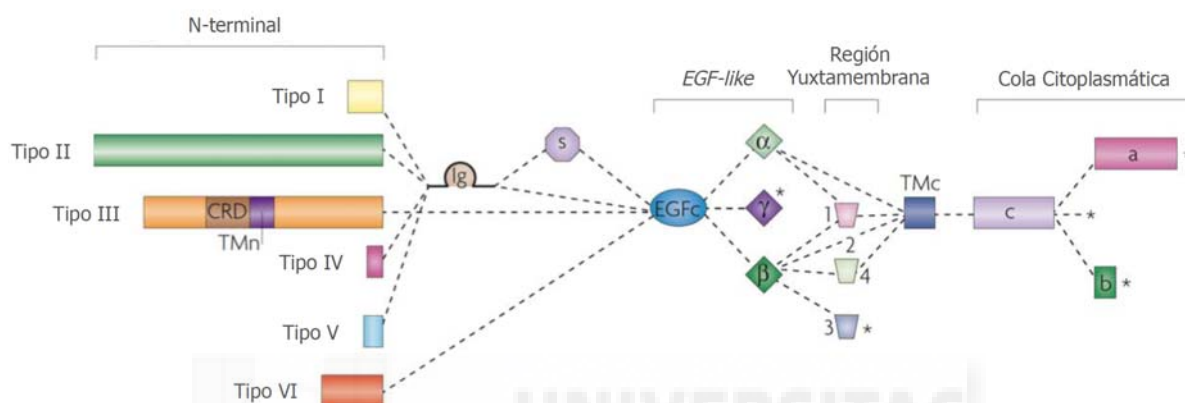


Figura 15: Las diferentes isoformas de NRG1. Los seis tipos de neuregulinas están clasificados atendiendo a la secuencia de su N-terminal. Todos tienen en común el dominio *EGF-like*. Los tipos I, II, IV y V tienen un dominio *Ig-like* entre el N-terminal y el dominio *EGF-like*, con o sin la región espaciadora (S), mientras que la región N-terminal de los tipos III y VI conecta directamente al dominio *EGF-like*. Las variantes están también generadas por procesamiento alternativo en la región yuxtamembrana y el C-terminal. Entre las dos regiones se encuentra el dominio transmembrana del C-terminal (TMc). Con un asterisco (*) se indica las posibles terminaciones (figura modificada de Mei y Xiong, 2008).

La presencia de un dominio inmunoglobulina tanto en las isoformas de tipo I como en las de tipo II ha hecho que se les denomine conjuntamente como Ig-NRG, distinguiéndolas de las CRD-NRG que representan a las tipo III.

Existen otros tres tipos de isoformas atendiendo al N-terminal mucho menos caracterizadas, el tipo IV, V y VI (Steinthorsdottir, Stefansson et al. 2004).

El dominio *EGF-like* es necesario y suficiente para provocar la activación del receptor, como se ha comprobado con una construcción recombinante y una versión sintética del mismo. Además, los mutantes que carecen de este dominio no pueden unirse a sus receptores (Holmes, Sliwkowski et al. 1992;

Wen, Suggs et al. 1994; Barbacci, Guarino et al. 1995). El *EGF-like* se caracteriza por presentar seis cisteínas que forman tres puentes disulfuros intramoleculares. Todas las isoformas de neuregulinas presentan un único exón común, que codifica para las cuatro cisteínas del dominio *EGF-like*, y les confiere especificidad por el receptor. El *EGF-like* presenta en su región carboxilo terminal una secuencia variable que puede generar tres estructuras diferentes (tipo α , β o γ) con diferente afinidad por los receptores erbB, siendo las isoformas que presentan la secuencia tipo β las más activas (Wen, Suggs et al. 1994).

También existe una clasificación que se hace según la región yuxtamembrana que presenta la isoforma: puede ser 1, 2, 3 ó 4. Esta región yuxtamembrana es la secuencia que separa el dominio *EGF-like* de la membrana plasmática. Este dominio presenta diferencias en longitud y secuencia. También es la región donde se produce el corte proteolítico que produce la liberación de algunas neuregulinas al medio extracelular.

Otra clasificación en las isoformas transmembranales de neuregulina, es el tipo de cola citoplasmática que presenta después del dominio transmembrana que puede ser a, b ó c. Se diferencian en la cantidad y secuencia de residuos presentes en cada cola citoplasmática.

La expresión de las isoformas de la neuregulina ha sido estudiada con técnicas de hibridación *in situ* y mediante el uso de ratones modificados genéticamente. Uno de estos ratones fue el creado por el grupo de Birchmeier (Meyer y Birchmeier 1995), quienes generaron un ratón que expresaba el gen *lacZ* sustituyendo el dominio *EGF-like* del gen de la neuregulina 1. Con la tinción de la β -galactosidasa detectaron el patrón de expresión del gen en los tejidos del ratón mutante durante el desarrollo embrionario. En estos ratones, la expresión de la neuregulina 1 se detectó en el mesodermo, los rombómeros 2,4 y 6, en el arco branquial, el corazón y el tubo neural dorsal.

En general, las neuregulinas son altamente expresadas en el sistema nervioso, donde son sintetizadas principalmente por las neuronas (Falls, Rosen et al. 1993; Loeb, Khurana et al. 1999) siendo sus dianas las células gliales y los músculos. Sin embargo, también se han detectado a bajos niveles en las células dianas, sugiriendo una posible función autocrina. Por ejemplo se ha

podido detectar expresión de NRG1, aunque muy baja, en las células de Schwann (Raabe, Clive et al. 1996; Rosenbaum, Karyala et al. 1997) y en oligodendrocitos (Raabe, Suy et al. 1997; Deadwyler, Pouly et al. 2000).

En estadio embrionario E10, las neuregulinas de tipo I se detectan en los ganglios trigéminos, el nervio glosofaríngeo y el ganglio vagal, así como en algunas neuronas de los ganglios raquídeos (Meyer, Yamaai et al. 1997). En este mismo estadio, las neuregulinas de tipo II se detectan en la notocorda, expresándose a partir de E12 en la médula espinal y los ganglios raquídeos. Esta isoforma se encuentra también a bajos niveles en el músculo esquelético entre los estadios E12-E18 (Meyer, Yamaai et al. 1997).

La NRG1 de tipo III es la isoforma predominante en el sistema nervioso. Puede detectarse en los ganglios craneales, los ganglios raquídeos y la médula espinal entre los estadios E10 y E18. La expresión de la isoforma de tipo III persiste en adulto donde se expresa en las neuronas motoras y sensoriales, la corteza, en el área septo medial y a muy alto nivel en el núcleo facial y la habénula (Chen, Bermingham-McDonogh et al. 1994; Meyer, Yamaai et al. 1997).

Los receptores de las neuregulinas son receptores de la familia erbB. El primero de los miembros de la familia descritos fue el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, erbB1 o HER1) identificado como una proteína de membrana de 170 kDa que se fosforila en presencia de EGF (Carpenter, Lembach et al. 1975).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es filogenéticamente muy antiguo. Se conocen sus homólogos en diversos invertebrados como por ejemplo el receptor Let-23 en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Sternberg, Lesa et al. 1995) o el receptor Der en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Casci y Freeman 1999). En vertebrados, se han identificado 4 receptores de esta familia: el EGFR (erbB1/HER1) (Ullrich, Coussens et al. 1984), erbB2 (neu/HER2) (Schechter, Hung et al. 1985; Semba, Kamata et al. 1985), erbB3 (HER3) (Kraus, Issing et al. 1989; Plowman, Whitney et al. 1990) y erbB4 (HER4) (Plowman, Green et al. 1993).

En las células de Schwann, se detecta la expresión de los receptores erbB2, erbB3 y erbB4, aunque éste último en mucha menor cantidad (Levi, Bunge et al. 1995; Vartanian, Goodearl et al. 1997), pero no se detecta la expresión de erbB1 (Carroll, Miller et al. 1997). La señalización controlada por los receptores erbB empieza por la unión del ligando al dominio extracelular del receptor erbB. Esta unión estimula la homo- y hetero-oligomerización de estos receptores y su actividad tirosina quinasa.

El receptor erbB1 puede unir directamente seis tipos de ligandos que presentan un dominio *EGF-like*: el propio EGF (factor de crecimiento epidérmico), el TGF α (profactor de crecimiento transformante alfa), betacelulina, anfiregulina, epiregulina y HBEGF (por factor de crecimiento semejante a EGF que une heparina). ErbB1 no es capaz de unirse directamente a las neuregulinas, aunque sí puede ser reclutado como co-receptor por un receptor de neuregulinas como erbB3 o erbB4 (Alroy y Yarden 1997; Burden y Yarden 1997).

ErbB2 es un receptor peculiar ya que no presenta sitio de unión a ligando. Sin embargo es el receptor con más actividad tirosina-quinasa, y es capturado con gran afinidad por los otros receptores capaces de unir neuregulina (erbB3 y erbB4). Las isoformas del gen de NRG1 pueden reclutar a erbB2 en sus vías de señalización. Esto queda confirmado por el hecho de que el fenotipo de ratones que tienen interrumpido el gen de erbB2 o bien el gen de NRG1 muestran el mismo fenotipo (Wolpowitz, Mason et al. 2000).

ErbB3 también es un receptor particular ya que tiene poca o ninguna actividad de tirosina quinasa (Guy, Platko et al. 1994). Sin embargo, puede ser fosforilado mediante la asociación con otro receptor (trans-fosforilación). Esta característica implica que, al igual que lo que ocurre con erbB2, erbB3 forma fundamentalmente heterodímeros. De hecho, se ha visto que erbB3 es el receptor predilecto para formar dímeros con erbB2. Este dímero erbB2/erbB3 es el más potente de todos los pares que se pueden formar y es capaz de activar muchas vías de señalización (Pinkas-Kramarski, Shelly et al. 1996; Citri, Skaria et al. 2003).

ErbB4 por su parte, tiene una estructura y comportamiento similar a la de erbB1. Es capaz de formar homodímeros funcionales, así como

heterodímeros con erbB2 y erbB3.

La fosforilación de los residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de los receptores erbB permite su interacción con diferentes moléculas adaptadoras que desencadenarán una red de cascadas de señalización intracelular (Schlessinger 2000). A pesar de su elevada homología, los receptores erbB no presentan redundancia en lo que se refiere a la señal desencadenada. El estudio de los sitios fosforilables en la cola del receptor erbB1 ha permitido deducir que éste activa, principalmente, las vías de Ras-MAPK y la de PI3K-Akt, pero no es capaz de acoplarse directamente a esta última vía (Schulze, Deng et al. 2005). En cambio, el receptor carente de actividad quinasa erbB3 puede reclutar a PI3K, sobre todo cuando se encuentra formando dímeros con erbB2. De hecho, erbB3, es considerado el principal miembro de la familia encargado de activar esta vía de supervivencia celular (Waterman, Alroy et al. 1999). A pesar de no unirse con gran afinidad a ningún ligando, el receptor erbB2, es el compañero preferencial del resto de receptores erbB para formar complejos y, además, es el que se acopla a un mayor número de cascadas de señalización (Jones, Gordus et al. 2006) desencadenando así potentes señales mitógenas (Citri y Yarden 2006).

2.4.2. NRG1 controla el desarrollo de las células de Schwann y la mielinización.

La función *in vivo* de las neuregulinas en el desarrollo de las células de Schwann y la mielinización de los axones del SNP se ha estudiado mediante la generación de ratones manipulados genéticamente (tabla I).

Los primeros datos sobre la relevancia de NRG1 se obtuvieron al tratar de eliminar este gen del genoma murino. Los ratones nulos o *Knock-out* para las neuregulinas 1 (NRG1^(-/-)), fueron creados por el grupo de Carmen Birchmeier en 1995. Los embriones de estos ratones no llegan a nacer ya que presentan malformaciones cardíacas y una severa reducción numérica de varios tipos de células originadas en la cresta neural, como una ausencia de los SCp, malformaciones en los ganglios craneales y ausencia de neuronas sensoriales y simpáticas (Meyer y Birchmeier 1995).

Posteriormente el grupo de Tarpley generó un ratón *Knock-out* para las isoformas que contenían un dominio semejante a las Ig (Ig-NGR1^(-/-)), es decir, que es nulo para las isoformas de tipo I y tipo II, pero expresa normalmente las neuregulinas de tipo III (Kramer, Bucay et al. 1996). Esta mutación, al igual que la eliminación completa del gen, es letal durante el desarrollo embrionario. Los mutantes presentan alteraciones cardíacas y en los ganglios y nervios craneales, sin embargo no hay una pérdida en la transición de células de la cresta neural a SCp, y el linaje de las células de Schwann se produce con normalidad, sugiriendo que solo las isoformas de tipo III están implicadas en el desarrollo de éste. Posteriormente el grupo de Lorna Role creó un mutante para la isoformas tipo III, que tienen el dominio rico en cisteínas, CRD-NGR1^(-/-) (Wolpowitz, Mason et al. 2000). Estos ratones tienen un desarrollo embrionario normal sin deficiencias cardíacas (a diferencia de los ratones anteriormente descritos). Sin embargo, mueren al nacer al no poder respirar por no tener sinapsis neuromusculares funcionales. A pesar de llegar al nacimiento, estos mutantes presentan una severa alteración del número de neuronas motoras y sensoriales, y del número de SCp, además de una ausencia de células de Schwann en las terminales nerviosas durante la formación de la unión neuromuscular, confirmando la importancia de estas isoformas para el desarrollo del linaje de las células de Schwann.

A continuación, Lee y colaboradores crearon un ratón *Knock-out* para el receptor erbB2 (*erbB2*^(-/-)). Estos ratones mueren durante el desarrollo embrionario por problemas cardíacos, al igual que el ratón NRG1^(-/-), sugiriendo que la principal función *in vivo* los receptores erbB2 es la de ser receptores de las neuregulinas (Lee, Simon et al. 1995). Además este ratón presentaba entre otras cosas, una disminución en el número de células de Schwann.

Para estudiar el papel *in vivo* del receptor de neuregulinas erbB3, Rietmacher y colaboradores, crearon el ratón *knock-out erbB3*^(-/-). Unos pocos de los mutantes sobreviven hasta el nacimiento, pero la gran mayoría mueren durante el desarrollo embrionario. Estos ratones, al igual que los ratones *erbB2*^(-/-), presentan una ausencia de SCp y una gran disminución del número de neuronas motoras y sensoriales (Riethmacher, Sonnenberg-Riethmacher et al. 1997).

Todos estos modelos animales demuestran la importancia de la señalización NRG1-erbB en el desarrollo embrionario del linaje de las células de Schwann. Sin embargo, la primera evidencia de la importancia de las neuregulinas 1 en la mielinización axonal propiamente dicha (que ocurre durante el desarrollo postnatal) fue proporcionado por el estudio de Garratt y colaboradores, quienes analizaron el mutante condicional para erbB2 utilizando la Cre-recombinasa expresada bajo el promotor Krox20 ($Krox^{Cre/+}; erbB2^{flox/-}$). Estos autores observaron un normal desarrollo embrionario de las células de Schwann, pero la mielina formada con posterioridad era delgada, mostrando solamente unas pocas vueltas de la membrana sobre los axones del SNP (Garratt, Voiculescu et al. 2000).

Posteriormente, Michailov y colaboradores encontraron que los heterocigotos nulos en un alelo para la NRG1 ($NRG1^{EGF-like^{+/-}}$) o para la isoforma tipo III tenían un grosor de la mielina disminuido, reproduciendo el fenotipo descrito por Garratt y colaboradores. Además, observaron un aumento en el grosor de la capa de mielina (disminución del *g-ratio*) en el ratón transgénico Thy1-tipo III- β 1a NRG1, el cual sobre-expresa la isoforma III- β 1a en los ganglios raquídeos y motoneuronas. Curiosamente, la sobre-expresión de la isoforma II- β 1a no afecta al grosor de la capa de mielina, lo que sugiere que solo las isoformas de tipo III están implicadas en el control de la mielinización axonal en el SNP (Michailov, Sereda et al. 2004). Recientemente se ha sugerido que el efecto diferencial de las diferentes neuregulinas en la mielinización podría estar relacionado con su capacidad para activar con distintas eficiencias las vías de la PI3K y la de MAPK (Syed, Reddy et al. 2010). Aunque los mecanismos no han sido esclarecidos, todos los experimentos sugieren que en el nervio periférico hay un equilibrio fino de la señalización por diferentes neuregulinas 1.

Genotipo	Fenotipo	Sistema Nervioso Periférico
NRG1^(-/-)	No viable (malformación cardíaca)	Ausencia células de Schwann (SC)
Ig-NRG1^(-/-) (tipo I y II KO)	No viable (malformación cardíaca)	Los SCp se producen
CRD-NRG1^(-/-) (tipo III KO)	Muere a P0 (problemas respiratorios)	Marcada reducción en el número de SC y motoneuronas
erbB2^(-/-)	No viable (malformación cardíaca)	Ausencia neuronas SNP derivadas de la cresta neuronal. Disminución número SC
erbB3^(-/-)	No viable o muere a P0	Ausencia neuronas SNP derivadas de la cresta neuronal. Disminución número SC
Krox20^(Cre/+) / erbB2^(Flox/-)	Viable	Disminución grosor mielina No hay cambios en el número de SC
NRG1 EGF-like^(+/-)	Normal	Disminución grosor mielina No hay cambios en el número de SC
Thy1-tipo III-β1a NRG1	Viable Síntomas neurológicos	Aumento grosor capa mielina No hay cambios en el número de SC

Tabla I: Enumeración de los ratones modificados genéticamente utilizados para el estudio *in vivo* de la función de la NRG1. Los experimentos de modificación genética en ratones han mostrado que además del papel en el desarrollo del SNP, las neuregulinas también juegan un papel importante en el SNP maduro y la mielinización de los axones por las células de Schwann.

Además de controlar el grosor de la capa de mielina, las neuregulinas tipo III instruyen a las células de Schwann sobre que axones tienen que ser mielinizados. Un experimento ilustrativo del papel de las NRG1 tipo III en la instrucción de la mielinización axonal del SNP fue el realizado por Taveggia y colaboradores, con neuronas simpáticas en cultivo. Estas neuronas no se mielinizan *in vivo* y tampoco *in vitro*. Sin embargo, cuando se las forzó a expresar NRG1 tipo III-β1a mediante de la infección por un lentivirus, muchas de las neuronas simpáticas resultaron mielinizadas al ser co-cultivadas con células de Schwann (Taveggia, Zanazzi et al. 2005).

En resumen, teniendo en cuenta estos (y otros) experimentos, se cree que los axones de las neuronas que expresan altos niveles de NRG1 tipo III proporcionan una señal que induce su mielinización; los niveles intermedios de NRG1 inducen una débil mielinización mientras que los bajos niveles de esta isoforma promueven la diferenciación a células de Schwann no mielinizantes (Taveggia, Zanazzi et al. 2005; Nave y Salzer 2006).

2.4.3. La desregulación de la vía NRG1-erbB como origen de algunas patologías: implicación en el cáncer.

Además de su importante papel fisiológico (y posiblemente a consecuencia de este) la desregulación de la señalización por neuregulinas ha sido implicada en algunas patologías. Así, se han descrito alteraciones en la expresión de neuregulinas en diferentes tipos de cáncer humano adjudicándoles un notable papel en el desarrollo y progresión de estos (Stove y Bracke 2004; Breuleux 2007). La acción de las neuregulinas en los tumores es debido a la ganancia de función, activándose la vía autocrina o aumentando su sensibilidad a la señalización paracrina (Breuleux 2007; Montero, Rodríguez-Barrueco et al. 2008).

El papel la vía de las neuregulinas se ha estudiado principalmente en el cáncer de mama, donde se ha descrito un aumento en la expresión de algunos de sus receptores (erbB2), o la expresión de variantes mutadas de estos, constitutivamente activas. Además de la sobre-expresión del receptor, la expresión aberrante del ligando se cree que podría estar también implicada en el desarrollo de algunos cánceres. En la revisión de Montero y colaboradores se recoge que las neuregulinas son expresadas en una gran cantidad de tumores, como el cáncer de mama, próstata, colon, ovarios, y páncreas entre otros (Montero, Rodríguez-Barrueco et al. 2008). Múltiples estudios sugieren que las neuregulinas inducen la progresión del cáncer de mama a través de la adquisición de un fenotipo más agresivo, determinado por la independencia hormonal, resistencia a antiestrogénicos, capacidad tumorigénica aumentada (Tang, Perez et al. 1996), y mayor invasión (Tsai, Hornby et al. 2000; Yao, Xiong et al. 2001) y metástasis (Meiners, Brinkmann et al. 1998; Atlas, Cardillo et al. 2003; Tsai, Shamon-Taylor et al. 2003).

Interesantemente, la capacidad tumorigénica e invasiva de líneas de adenocarcinoma se ha visto reducida con la inactivación de la vía de las neuregulinas por anticuerpos específicos frente a sus receptores (impidiendo la heteromerización de los receptores) (Hijazi, Thompson et al. 2000), o con la reducción de sus niveles utilizando oligonucleótidos antisentido (bloqueando su señalización intracelular) (Tsai, Shamon-Taylor et al. 2003), abriendo la posibilidad de utilizar la vía de las neuregulinas como diana terapéutica para el tratamiento de éste u otros tipos de cáncer causados por su desregulación.

3. ¿Tiene NRG1 un papel en la regulación de la mielinización del SNC?

Los oligodendrocitos son las células mielinizantes en el SNC. Los oligodendrocitos mielinizantes son el producto final de un linaje celular, que tiene un complejo y preciso programa de proliferación, migración y diferenciación cuyo objeto es recubrir con una capa de mielina los axones del SNC.

En la médula espinal, la mayoría de los oligodendrocitos derivan de la zona ventricular ventral, donde primero se generan las neuronas motoras, y después se produce un cambio de neurogénesis a gliogénesis, generándose las células precursoras o progenitoras de los oligodendrocitos (OPCs). De esta región migran al resto de la médula antes de diferenciarse en oligodendrocitos mielinizantes (Cai, Qi et al. 2005). Después de esta oleada de oligodendrocitos, hay otra oleada procedente de la zona dorsal de la médula, que llega a contribuir con el 10-15% de la población final de los oligodendrocitos en esta estructura (Fogarty, Richardson et al. 2005). En el cerebro, los primeros OPCs se originan en la eminencia ganglionar media y área entopeduncular anterior. Estos OPCs pueblan el tele-encéfalo entero incluyendo la corteza cerebral. A estos se une una segunda oleada de OPCs procedentes de las eminencias laterales y caudal. La tercera y última oleada de OPCs se origina en la propia corteza durante el desarrollo posnatal (Kessaris, Fogarty et al. 2006).

Estos OPCs migran para formar lo que será la sustancia blanca en el adulto. Durante esta migración, los OPCs pasan al estadio de progenitores de oligodendrocitos, caracterizándose por una morfología bipolar y la expresión del receptor de PDGF α , y el proteoglicano NG2 (figura I6). A continuación

pasan a ser pre-oligodendrocitos, con una morfología en forma de estrella y caracterizados por la expresión del sulfátido O4. Posteriormente se transforman en oligodendrocitos inmaduros expresando el marcador de la galactoceramida (GalC). Después pasan a oligodendrocitos maduros expresando MBP, MAG y PLP, y el último paso de la diferenciación es la transformación a oligodendrocitos mielinizantes que expresan de manera característica MOG (Baumann y Pham-Dinh 2001; Ndubaku y de Bellard 2008; Bradl y Lassmann 2010).

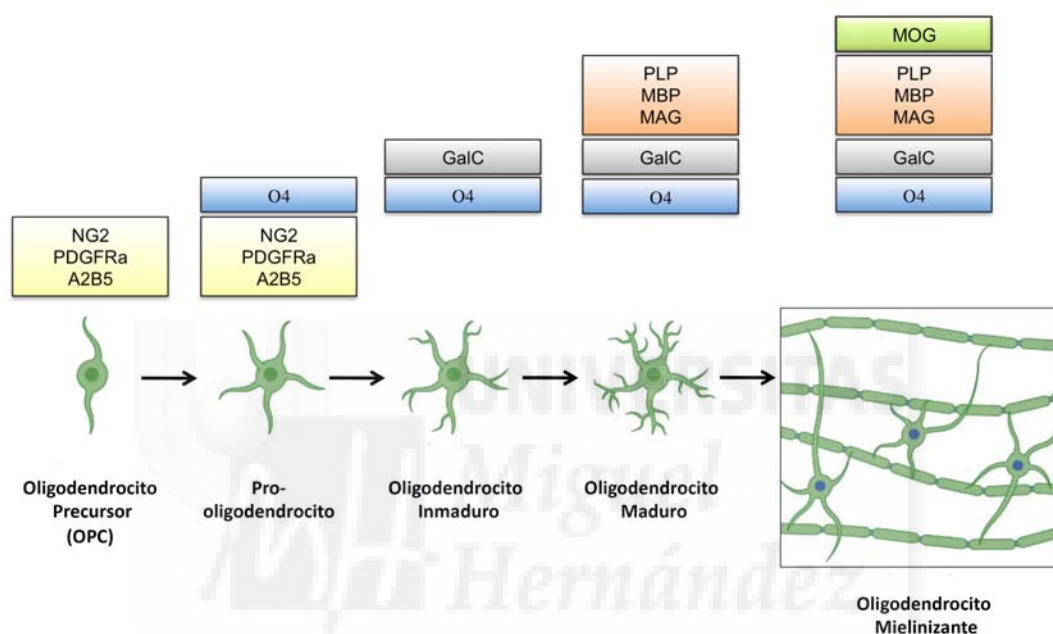


Figura 16: El linaje de los oligodendrocitos y los diferentes marcadores presentes en cada tipo celular durante su diferenciación (Imagen modifica de Baumann y Pham-dinh, 2001; y Ndubaku y Bellard, 2008).

El papel de la neuregulina 1 en la mielinización en el SNC no ha sido caracterizado del todo, al no poder emplear el modelo del ratón *knockout* para la NRG1. Este ratón muere en el estadio embrionario de 10,5 días, antes del desarrollo de los oligodendrocitos (Meyer, Yamaai et al. 1997). Por el mismo motivo no se han podido realizar estos estudio en los ratones nulos para los receptores erbB2, erbB3 y erbB4.

Sin embargo, y en base a lo observado en el SNP, hasta hace poco tiempo, se pensaba que señalización por la vía de NRG1-erbB podría estar también implicada en la regulación de la mielinización del SNC. Sin embargo estudios recientes sugieren que la señalización a través esta vía tiene efectos

notablemente diferentes en la mielinización del SNP y SNC. Con el empleo de ratones *knockout* condicionales para la NRG1 en diferentes estadios del desarrollo neural, Brinkmann y colaboradores (2008) han establecido recientemente que la pérdida de la expresión de este gen en neuronas no produce alteraciones en el desarrollo ni la mielinización del SNC. Lo mismo sucede en los ratones *knockout* condicionales para erbB3 y erbB4 en oligodendrocitos. Este estudio demuestra que la señalización por la vía NRG1-erbB es prescindible en el proceso de mielinización del SNC (Brinkmann, Agarwal et al. 2008). Sin embargo, en el estudio también se ha demostrado que la sobre-expresión de las neuregulinas tipo I o tipo III provoca una hipermielinización de unos pocos axones en determinadas regiones del SNC (Brinkmann, Agarwal et al. 2008). Estos datos sugieren que aunque prescindible, la señalización por NRG1 puede contribuir, junto con otras señales, al control de mielinización del SNC. En este sentido, en un reciente estudio, Goebbles y colaboradores sugieren que la regulación de la mielinización en el SNC responde esencialmente a los niveles de activación de la vía de PI3K, y que cualquier señal que module esta vía (como por ejemplo NRG1) contribuye al control de la mielinización por los oligodendrocitos (Goebbels, Oltrogge et al. 2010). Puesto que la activación de PI3K en los oligodendrocitos depende de otros muchos factores, la eliminación de NRG1 o sus receptores no tendría una contribución significativa en la mielinización. Sin embargo, la sobre-expresión de NRG1 sí podría contribuir a incrementar el grosor de la capa de mielina al sobre-activar esta vía.

En resumen, aunque es posible que las neuregulinas contribuyan a la mielinización del SNC, su relevancia parece ser mucho menor que la que tienen en el SNP.



Objetivos

En esta tesis trataremos de contribuir a esclarecer el papel de las distintas isoformas de neuregulina 1 en la mielinización del sistema nervioso. Estudios previos habían sugerido que las isoformas tipo III (y solo ellas) controlan la mielinización del sistema nervioso periférico. Dos isoformas tipo III han sido descritas, la tipo III- β 1a y la III- β 3, siendo la primera de ellas la única caracterizada hasta el momento *in vivo*. El objetivo de esta tesis es la caracterización *in vivo* del papel de la neuregulina 1 de tipo III- β 3 (o SMDF) en la mielinización del sistema nervioso. Para ello utilizaremos ratones que sobre-expresan SMDF en neuronas. Estos ratones, generados en nuestro laboratorio, contienen el cDNA que codifica para la neuregulina humana SMDF (hSMDF) bajo el promotor de la enolasa específica neuronal (NSE) de rata (ratones *NSE-hSMDF*).

Los objetivos específicos son:

1.- Caracterización de la integración y expresión del transgén en las dos líneas de ratones transgénicos *NSE-hSMDF* obtenidas.

2.- Determinación de los efectos de la expresión del transgén en la mielinización del sistema nervioso central y periférico mediante técnicas bioquímicas y moleculares.

3.- Exploración morfológica, ultraestructural e inmunohistoquímica del proceso de mielinización en el SNC y SNP de los ratones transgénicos.

4.- Evaluación funcional del sistema nervioso de los ratones transgénicos: caracterización electrofisiológica.

5.- Determinación de los posibles efectos patológicos de la ganancia de función en la señalización axón-glia mediada por neuregulinas.



Resultados

1. Sobre-expresión neuronal *in vivo* de la neuregulina tipo III- β 3 humana (hSMDF): generación de ratones *NSE-hSMDF*.

Que las neuregulinas juegan un papel fundamental en el control de la mielinización del sistema nervioso periférico ha sido inequívocamente establecido durante el transcurso de los últimos diez años (Salzer 2008). Interesantemente también ha sido demostrado que el efecto promielinizante está restringido a algunas de las isoformas codificadas por NRG1. Así se ha demostrado que la sobre-expresión neuronal de una neuregulina tipo III (la isoforma tipo III- β 1a) provoca un aumento generalizado en el grosor de la capa de mielina en el sistema nervioso periférico. Curiosamente, estos mismos autores han observado que la sobre-expresión de otra isoforma de neuregulina (tipo I) no produce efecto alguno en la mielinización (Michailov, Sereda et al. 2004).

Al menos dos isoformas de neuregulina tipo III han sido descritas, la III- β 1a y la III- β 3. La mayor parte de los estudios sobre mielinización se han realizado con la primera de ellas, siendo la función *in vivo* de la última poco conocida. Para estudiar el papel fisiológico de la neuregulina III- β 3 decidimos generar un ratón transgénico que sobre-expresará la versión humana de esta isoforma (hSMDF) bajo el promotor de la enolasa específica neuronal de rata (*NSE*). La enolasa neuronal es una proteína que se expresa en neuronas diferenciadas a partir del estadio E18. La región del promotor utilizada en nuestro estudio ha sido previamente empleada para dirigir la expresión de la β -galactosidasa en ratones transgénicos, donde se ha podido comprobar que reproduce con fidelidad el patrón de expresión del gen endógeno (Forss-Petter, Danielson et al. 1990).

1.1. Construcción del plásmido *NSE-hSMDF*.

El plásmido *pNSE-hSMDF* se obtuvo mediante la inserción del cDNA que codifica para el SMDF humano (*hSMDF*) tras el promotor de la enolasa específica neuronal de rata (*NSE*) en el vector *pNSECAT* (Forss-Petter, Danielson et al. 1990). Este vector fue cedido amablemente por el Profesor. W.D. Richardson (del *Wolfson Institute for Biomedical Research, UCL*). Para más detalles ver publicación (Forss-Petter, Danielson et al. 1990).

1.2. Microinyección en oocitos y obtención de líneas de ratones transgénicos.

El vector *pNSE-hSMDF* se digirió con EcoRI, y el fragmento que contenía el promotor con el inserto y el sitio de poliadenilación de SV40 se inyectó en oocitos fecundados, que posteriormente se implantaron en ratonas receptoras pseudogestantes (figura R1). Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Profesor W.D. Richardson en Londres.

Tras la microinyección se obtuvieron dos líneas de ratones fundadores capaces de transmitir el transgén a la descendencia. Los dos fundadores obtenidos, uno macho y otro hembra, generaron dos líneas de ratones transgénicos diferentes al ser cruzados con animales silvestres de la cepa C57BJ6. Durante este trabajo, se especificará la línea de ratones con la que se realizó cada experimento como *NSE-hSMDF#1* (línea procedente de la hembra fundadora), y *NSE-hSMDF#2* (línea procedente del macho fundador).

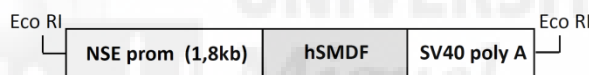


Figura R1: Construcción del transgén *NSE-hSMDF*. Secuencia inyectada en los oocitos del ratón, tras digestión con EcoRI.

1.2.1. Evaluación del número de copias integradas mediante PCR cuantitativa (qPCR).

La microinyección de DNA en los ovocitos fecundados resulta en la integración aleatoria del transgén en el DNA genómico del pre-embrión. Generalmente la integración suele ser en un único sitio, pero el número de copias de transgén integrado es altamente variable, integrándose generalmente un número variable de copias en tándem. Para determinar el número de copias del transgén en cada cepa de ratón utilizamos PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) (Mitrecic, Huzak et al. 2005). Esta técnica nos permite conocer el número de copias de un gen problema, al ser comparado con un gen control. En este caso el gen control que se utilizó fue el gen de la proteína *Gap junction alpha 5* murina (mGJA5), que como la gran mayoría de genes se encuentra en dos copias en el genoma de ratón. Además para poder

obtener unos resultados fiables, se utilizaron tres diluciones diferentes del DNA genómico (12ng/ μ l, 6ng/ μ l y 3,5ng/ μ l). Con estas diluciones se pudo calcular la eficiencia de la PCR cuantitativa. Si la eficiencia era menor del 90% o superior al 110%, los resultados eran descartados.

Como se puede observar en la figura R2, mientras que el ciclo umbral o C_t del gen control (*mGJA5*) es el mismo en ambas líneas, la C_t del transgén (*NSE-hSMDF*) es claramente distinta para cada una de las líneas. Aplicando la fórmula de $2^{-\Delta C_t}$ se obtuvo el número de copias insertadas en cada genoma de las dos líneas de ratones modificados genéticamente. Puesto que los productos amplificados del control son del mismo tamaño que los del transgén (365pb), y el número de copias del *housekeeping* (gen control) es de dos al estar presente en los dos cromosomas, se pudo estimar el número de copias del transgén integradas por genoma. Teniendo en cuenta que los ratones transgénicos utilizados en el estudio fueron siempre heterocigotos, pudimos estimar que el número de copias del transgén es de 24 en la línea *NSE-hSMDF#1*, y de 7 copias en el caso de la línea *NSE-hSMDF#2*.

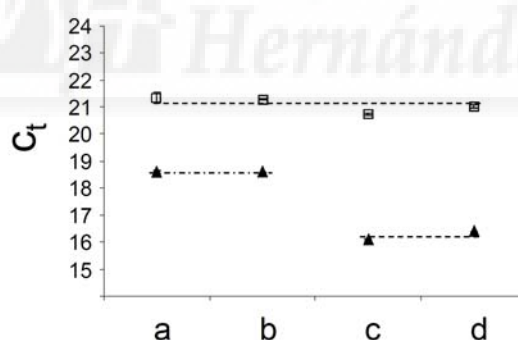


Figura R2: Número de copias del transgén insertadas en el genoma del ratón transgénico. Cálculo de la C_t mediante qPCR para el *housekeeping* *mGJA5* (cuadrados blancos) y para el transgén (triángulos negros). El tamaño del amplificado y la eficiencia en ambos genes fue la misma; el número de copias calculado fue: 7 copias para la línea del *NSE-hSMDF#2*^(+/-) (muestras a y b), y 24 copias para la línea *NSE-hSMDF#1*^(+/-) (muestras c y d).

Además, y para comprobar que no hay ninguna mutación, realizamos una secuenciación completa de un producto de PCR amplificado a partir del DNA genómico extraído de estos ratones. Esta aproximación nos permitió confirmar que la secuencia del transgén no presenta mutaciones, ni en el promotor ni en la secuencia codificante para el hSMDF (no mostrado).

1.3. Expresión del transgén en las diferentes líneas de ratones.

Aunque el promotor *NSE* ha sido ya ampliamente utilizado para dirigir la expresión de otros genes en neuronas (Forss-Petter, Danielson et al. 1990; Fruttiger, Calver et al. 1996; Calver, Hall et al. 1998), como ya he indicado con anterioridad, la posición de integración de un transgén en el genoma es aleatoria. Esto puede provocar que, en algunas situaciones, el contexto genético modifique el patrón de expresión del transgén, resultando en un patrón de expresión aberrante que no refleja exactamente el dictado del promotor. Por ello nuestro primer objetivo fue caracterizar el patrón de expresión del transgén en estos animales.

1.3.1. El promotor *NSE* dirige la expresión del transgén a las neuronas.

Inicialmente estudiamos en qué tejidos podía ser detectado el mRNA del transgén *NSE-hSMDF*. Para ello obtuvimos RNA total de diferentes tejidos y realizamos una retrotranscripción. Para eliminar cualquier contaminación de DNA genómico que se pudiera haber purificado junto al RNA, la reacción se trató con DNasa I (libre de RNAsas). Una vez obtenido el cDNA realizamos una PCR con oligonucleótidos específicos para el transgén (*NSE-hSMDF*), y para un gen control (*SREBP2*). Para tener un control extra en la PCR, se realizó de forma paralela a la síntesis del cDNA una reacción de retrotranscripción “falsa” (-RT), que consistió en poner todos los elementos de la síntesis de cDNA excepto la transcriptasa inversa.

Como se puede apreciar en la figura R3, en ambas líneas el transgén se expresa en los tejidos neurales, como son el cerebro anterior, cerebelo, médula, ganglio trigémino y nervio ciático, mientras que en tejidos no neurales como corazón, riñón e hígado no hay expresión del transgén. Esto demuestra

que el promotor es activo en el tejido nervioso, tal y como se esperaba, puesto que se trata del promotor para una proteína que fisiológicamente se expresa únicamente en neuronas.

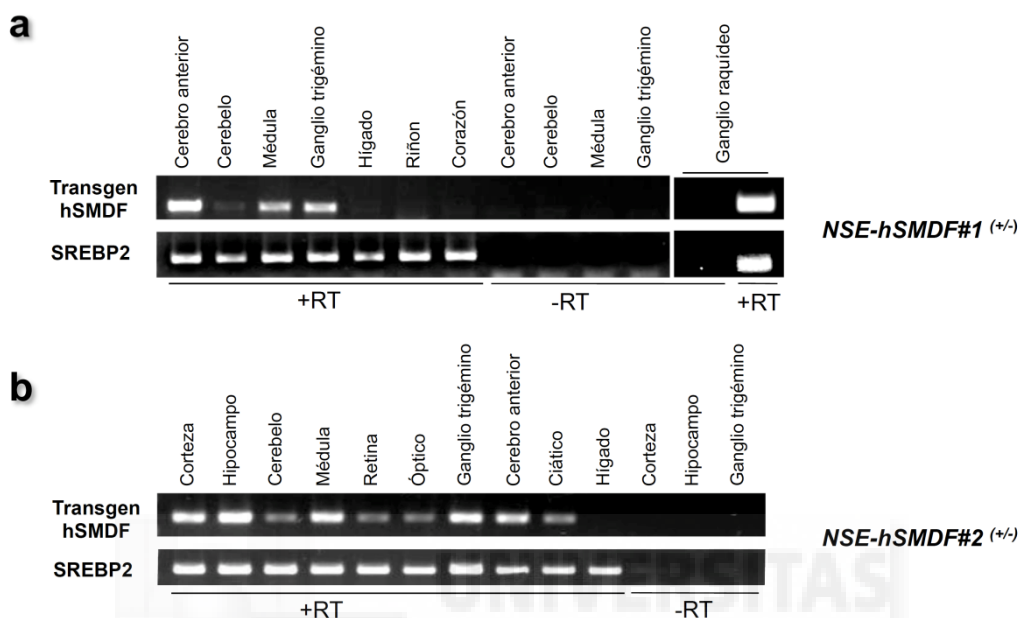


Figura R3: La expresión de *hSMDF* se produce en tejidos neurales en los ratones transgénicos debido al promotor de la enolasa neuronal específica. **a.** RT-PCR del transgén y *SREBP2* (+RT) en diferentes tejidos neurales y no neurales en la línea *NSE-hSMDF#1*^(+/-), además de falsas retrotranscripciones donde se omitió la transcriptasa reversa (-RT). **b.** En los ratones *NSE-hSMDF#2*^(+/-) se expresa el transgén en los mismos tejidos que en los de la línea #1. Algunas muestras adicionales han sido incluidas en este experimento para detallar mejor el patrón de expresión.

A continuación determinamos los niveles de expresión del transgén comparándolos con los niveles endógenos de SMDF. Para ello cuantificamos (mediante qPCR) los niveles de mRNA de SMDF en el ganglio trigémino de los ratones *NSE-hSMDF#1*^(+/-) y sus hermanos de camada silvestres. Para ello empleamos *primers* (oligonucleótidos iniciadores) específicos capaces de amplificar al mismo tiempo el cDNA del SMDF humano y murino. Los resultados obtenidos se resumen en la figura R4a. Como se observa en esta gráfica hay una notable sobre-expresión de SMDF en las neuronas de los ratones *NSE-hSMDF#1*^(+/-). Estos animales transgénicos expresan seis veces más mRNA de SMDF que los ratones silvestres. En la línea *NSE-hSMDF#2*^(+/-) el aumento es de 2,6 veces respecto a los animales silvestres.

Para averiguar si el promotor *NSE* dirige realmente la expresión del transgén a las neuronas y no a las células gliales utilizamos técnicas de hibridación *in situ*. Esta técnica se basa en la capacidad de los ácidos nucleicos para hibridarse entre sí cuando encuentran secuencias complementarias. En nuestro caso utilizamos una sonda de RNA (marcada con digoxigenina) específica para la forma humana de SMDF, que hibrida con el RNA mensajero que se produce exclusivamente en las células donde se expresa el transgén. La hibridación fue detectada mediante una tinción colorimétrica producida por la fosfatasa alcalina, la cual procesa el sustrato NTB/BCIP dando un intenso color violeta. Esta enzima está conjugada a un anticuerpo monoclonal que reconoce la digoxigenina, incorporada en la secuencia de la sonda durante el proceso de marcaje. Como se aprecia en la Figura R4b, en ambas líneas de ratones, el transgén se pudo detectar en la sustancia gris de la médula espinal (donde se sitúan los somas de las neuronas) y no en la sustancia blanca (donde se sitúan las células gliales). Estos resultados sugieren que el transgén se expresa únicamente en las neuronas, como cabía esperar al estar bajo el promotor de la enolasa neuronal.

Para comprobar si la sobreexpresión del transgén se traduce en un aumento en los niveles de proteína utilizamos la técnica de *Western blot*. Estos estudios se realizaron en la línea *NSE-hSMDF#1* puesto que tiene un mayor número de copias del transgén integradas en su genoma. Aprovechando que SMDF es una proteína glicosilada (Cabedo, Carteron et al. 2004), se concentraron las proteínas glicosiladas de extractos de cerebro y de nervio ciático mediante la lectina de germen de trigo o WGA ("*wheat germ agglutinin*"), que une los oligosacáridos con residuos de N-acetilglucosamina. Como control positivo se utilizaron células COS7 transfectadas con un plásmido que expresa SMDF (*pcDNA3-hSMDF*) en células de mamífero, y como control de carga un anticuerpo contra una proteína glicosilada como es erbB3. Nuestros resultados demuestran que, al igual que ocurre con el mRNA, los ratones *NSE-hSMDF#1*^(+/-) tienen unos niveles de proteína SMDF mayores que sus hermanos silvestres (Figura R4c).

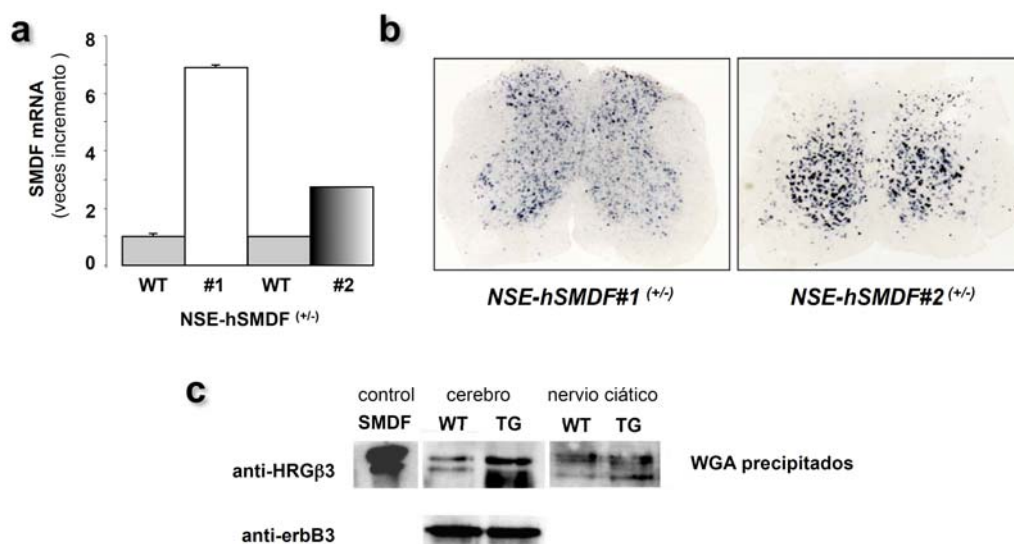


Figura R4: Expresión del transgén. **a.** Cuantificación por qPCR de los niveles de mRNA de SMDF en los ratones *NSE-hSMDF*^(+/+) (líneas #1 y #2) y sus hermanos silvestres de camada. Utilizamos cDNA sintetizado a partir del RNA de los ganglios trigéminos de ratones de dos meses de edad. Niveles normalizados con el gen 18S y dos ratones por genotipo. **b.** Hibridación *in situ* con la sonda *hSMDF* en la médula espinal en las dos líneas de ratones transgénicos. **c.** Los niveles de la proteína SMDF están aumentados en el cerebro y nervio ciático del ratón transgénico de la línea *NSE-hSMDF#1*^(+/+), medidos por *Western blot* de extractos de tejido nervioso de animales silvestres y mutantes concentrados con la lectina WGA e incubados con anti-HRGβ3 (SMDF) y anti-erbB3 (control de carga).

1.3.2. Perfil de expresión temporal del transgén.

La expresión del promotor *NSE* se incrementa de una manera gradual durante el desarrollo postnatal (Forss-Petter, Danielson et al. 1986; Forss-Petter, Danielson et al. 1990). Para conocer en detalle la expresión del transgén en los ratones *NSE-hSMDF*^(+/+) cuantificamos, mediante qPCR los niveles de mRNA en el ganglio trigémino de los ratones *NSE-hSMDF#1* en estadio embrionario de 16 días (E16), y a la edad de 5 (P5) y 20 días (P20).

Como se puede apreciar en la figura R5a, en el estadio embrionario el transgén es apenas detectado, mientras que a los cinco días presenta una fuerte expresión, que se mantiene hasta los 20 días de edad. Nuestros datos confirman los de Forss-Peters y colaboradores (1990). Estos autores observaron que la expresión de niveles significativos de la proteína β galactosidasa ocurría a partir del estadio E18 en los ratones transgénicos *NSE-*

lacZ, coincidiendo con el inicio de la expresión de la enolasa neuronal endógena.

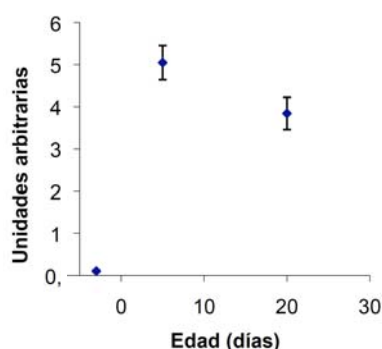


Figura R5: Perfil de expresión del transgén en los ratones mutantes de la línea #1, a los 16 días de desarrollo embrionario, y a los 5 y 20 días de edad. Los niveles de mRNA del transgén se normalizaron frente a los del 18S.

2. Efectos de la sobre-expresión neuronal de la neuregulina III- β 3 en la mielinización del sistema nervioso central.

Mientras que el papel del gen NRG1 en el control de la mielinización del SNP está bien documentado, no ocurre lo mismo en el SNC. Así, mientras parece que la sobre-expresión neuronal de NRG1 aumenta el grosor de la mielina en algunos axones, el efecto dista mucho de ser generalizado. Es más la eliminación total del gen NRG1 de las neuronas del SNC mediante métodos genéticos no tiene efecto alguno sobre la mielinización (Brinkmann, Agarwal et al. 2008). Para contribuir a esclarecer el papel de la NRG1 en la mielinización del SNC, determinamos su estado de mielinización en los animales *NSE-hSMDF#1^(+/-)* mediante distintas aproximaciones que se detallan a continuación.

2.1. Efectos del transgén sobre los niveles de RNA mensajero para las proteínas de la mielina.

En la figura R6a, se muestran los niveles de RNA mensajero para las proteínas de la mielina en muestras del cerebro anterior de ratones de 20 días de edad. Se puede observar que los niveles de RNA mensajero para estas proteínas en los ratones transgénicos son generalmente superiores. Este

incremento llega a ser un 29% superior en el caso del MBP (proteína básica de la mielina) y CNPasa (2', 3'- nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa), y a un 19% en el de la PLP (proteína proteolípídica de la mielina).

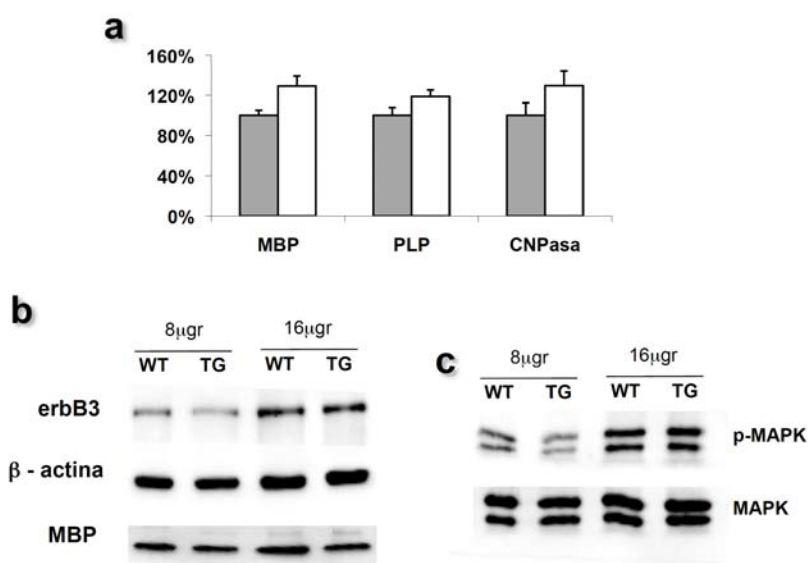


Figura R6: La sobre-expresión de hSMDF en el sistema nervioso central provoca cambios significativos en los marcadores de mielinización. **a.** RT y qPCR de RNA mensajero de proteínas de la mielina (MBP y PLP) y marcadores gliales (CNPasa), a partir de extractos de cerebro de ratones *NSE-hSMDF#1^(+/+)* y sus hermanos de camada silvestres a P20. Los resultados están normalizados respecto al RNA ribosómico de 18S. **b.** *Western blot* de extractos de cerebro a P20, donde se observa que no existen diferencias apreciables en los niveles de MBP entre ambos genotipos. **c.** Tampoco se encontraron diferencias en el grado de activación de la vía de la MAPK.

2.2. Efectos a nivel de proteína.

Para comprobar si el aumento en los niveles de mensajero se traducían en un aumento en los niveles de las proteínas de la mielina, se utilizó la técnica del *Western blot*, donde se estudió la proteína básica de la mielina (MBP) como marcador de mielinización, y el receptor erB3, y la β-actina como controles de carga.

Como se aprecia en la figura R6b, no encontramos diferencias en los niveles de la proteína MBP entre los extractos de proteínas del cerebelo-troncoencéfalo de los ratones silvestres y transgénicos de 20 días de edad. Estos datos sugieren que los cambios en los RNAs mensajeros de las proteínas de la mielina no son de suficiente entidad como para traducirse en

cambios reales a nivel de proteína, y por lo tanto carecen de relevancia fisiológica.

La vía de la MAPK tiene un papel importante en la proliferación y diferenciación de los oligodendrocitos (Bhat y Zhang 1996; Baron, Metz et al. 2000). Para saber si la expresión del transgén llega a provocar algún cambio en los niveles de activación de la vía de la MAPK en los ratones mutantes, hicimos un inmunoblot de extractos proteicos de cerebro anterior a la edad de 20 días. Como muestra la figura R6c, la expresión del transgén no modifica de una manera estable y significativa el grado de activación de la vía de la MAPK (medida como el nivel de fosforilación de esta proteína) en el SNC de los ratones transgénicos.

2.3. Efectos sobre el grosor de la capa de mielina.

La cuantificación de los niveles de las proteínas de mielina es generalmente un reflejo del estado de mielinización axonal. Sin embargo esto no es siempre así (Forss-Petter, Danielson et al. 1990; Fruttiger, Calver et al. 1996; Calver, Hall et al. 1998). Con el objeto de obtener una información más detallada del estado de mielinización, utilizamos técnicas morfológicas. Mediante microscopía electrónica pudimos realizar el análisis detallado del grosor de la capa de mielina que envuelve los axones. Para hacer uso de esta técnica anestesiábamos profundamente los ratones con Ketamina y Xilacina, y a continuación los perfundimos con 2% de paraformaldehído y 2,5% de glutaraldehído. Disecamos los nervios ópticos, postfijándolos y contrastándolos con tetraóxido de osmio, para posteriormente incluirlos en resina epoxi. Tras tallar los moldes, se obtuvieron cortes ultrafinos (70-90nm de grosor) que se depositaron sobre una rejilla de cobre de 200nm de malla (tiñéndolos con acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynolds). Posteriormente obtuvimos imágenes de estas muestras con un microscopio electrónico de transmisión.

Para cuantificar el grosor de la capa de mielina en el nervio óptico utilizamos la razón "g" (en inglés *g-ratio*) de los axones mielinizados del nervio óptico. El *g-ratio* es la relación entre el diámetro del axón y el diámetro total de la fibra mielinizada, es decir, el diámetro del axón más el diámetro de la membrana de mielina. Como el *g-ratio* es la relación de dos diámetros, y el

diámetro es igual al perímetro dividido por el número pi, conociendo los perímetros del axón y de la fibra mielinizada es fácil calcular el *g-ratio* de la fibra (figura R7). Las medidas de los perímetros se obtuvieron con el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>, *National Institute of Health*), tal como se ilustra en la figura R7.

En la figura R7 se aprecia que en los ratones de 5 meses de edad no hay un cambio en el grosor de la capa de mielina, expresada como el *g-ratio* de más de 100 axones. Así mientras el ratón silvestre tiene un *g-ratio* de $0,783 \pm 0,004$, el ratón transgénico lo tiene de $0,776 \pm 0,005$. Esta es una diferencia insuficiente para tener significación estadística (prueba de t para muestras independientes, $n=2$ y $p=0,3022$).

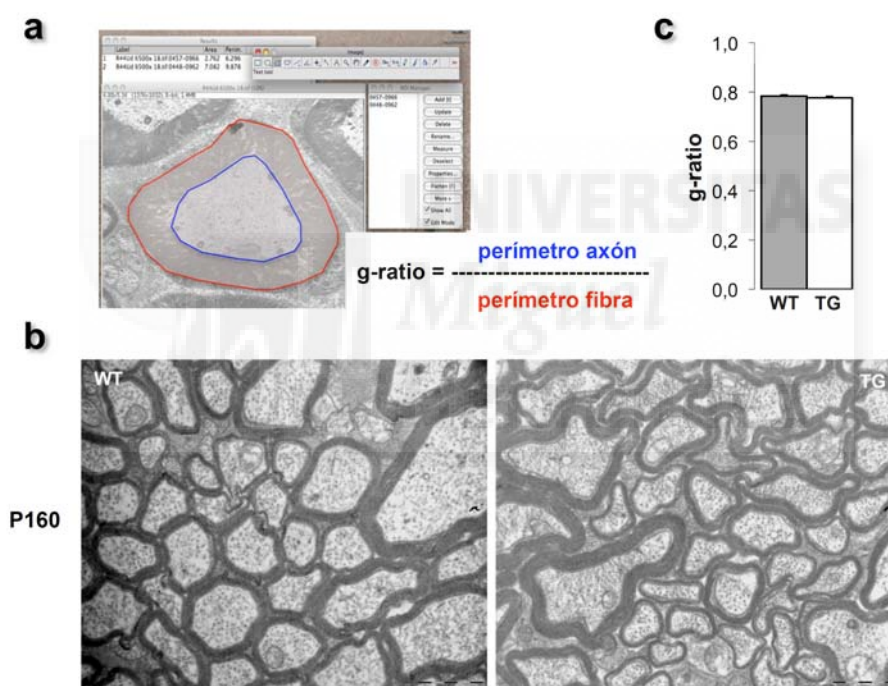


Figura R7: La sobreexpresión del transgén no afecta al grosor de la capa de mielina en el nervio óptico. **a.** Método de cuantificación del *g-ratio*: se empleó el programa ImageJ para determinar el perímetro del axón y el perímetro de la vaina de mielina. A continuación se calculó el *g-ratio* dividiendo los dos valores. **b.** Imágenes de microscopía electrónica del nervio óptico de un animal silvestre y transgénico donde se aprecia que no hay diferencias en el grosor de la capa de mielina. **c.** La cuantificación de más de 100 axones por genotipo mostró que no existen diferencias significativas en el *g-ratio* entre ambos genotipos (prueba de t para muestras independientes, $n=2$ y $p=0,3022$).

Estos datos, tomados en conjunto con los de la cuantificación del RNA mensajero y de las proteínas de la mielina sugieren que la sobre-expresión neuronal de la neuregulina 1 tipo III- β 3 no tiene efecto alguno en el proceso de mielinización en el sistema nervioso central, y apoyan la idea de que el papel de NRG1 en la mielinización del SNC no es tan importante como en el SNP.

3. Consecuencias de la sobre-expresión neuronal de la neuregulina III- β 3 en la mielinización del sistema nervioso periférico.

En el transcurso de los últimos diez años, gracias al trabajo de numerosos laboratorios ha quedado elegantemente demostrado que el gen NRG1 es fundamental para numerosos aspectos del desarrollo del linaje de las células de Schwann. Además de fundamental para el desarrollo de este tipo células, se ha demostrado que diversos productos de este gen también controlan finamente el estado y los niveles de mielinización de los axones del SNP (Jessen y Mirsky 2005; Birchmeier y Nave 2008).

3.1. La sobre-expresión neuronal de SMDF provoca una activación mantenida de las cascadas de señalización de la MAPK y la PI3K en las células de Schwann del nervio ciático.

El receptor de las neuregulinas (erbB), que tiene un dominio intracelular con actividad tirosina-kinasa, es capaz de transmitir señales intracelulares por la vía de RAS, a través de la “mitogen-activated protein kinase” (MAPK), y por la vía de la “phosphatidyl-inositol-3-kinase” (PI3K) (Ogata, Iijima et al. 2004). Recientemente se ha sugerido que la activación de cada una de estas vías tiene un efecto distinto en el proceso de la mielinización del sistema nervioso periférico. Mientras la activación de la vía PI3K conlleva a la diferenciación de las células de Schwann y la mielinización de los axones, la activación de la vía MAPK parece estar fundamentalmente implicada en la proliferación de las células de Schwann (Salzer 2008). Para averiguar si la sobre-expresión de SMDF modifica la señalización en los nervios periféricos, determinamos el grado de activación de cada una de estas vías mediante técnicas inmunológicas. La determinación grado de activación de la vía de Ras lo hicimos determinando el grado de fosforilación de la proteína MAPK. Para ello

utilizamos muestras de extractos de proteínas del nervio ciático de ratones con tres, diez y veinte días de edad. Para descartar que los cambios observados fueran consecuencia de variaciones en la expresión de MAPK (y no de su estado de fosforilación) utilizamos un anticuerpo que reconoce la proteína MAPK tanto si está como si no está fosforilada. Como se puede observar en la Figura R8, la vía de la MAPK no se encuentra más activada a los tres días de edad: la proteínas presentan el mismo grado de fosforilación en los dos genotipos. Sin embargo, a los 10 días de edad, la MAPK presenta unos niveles ligeramente superiores de fosforilación en los nervios mutantes, lo que indica que la sobre-expresión del transgén ya ha empezado a producir cambios en la activación de la vía de RAS. Finalmente, a los 20 días de edad, la proteína MAPK se encuentra notablemente más fosforilada (y por tanto más activada) en el ratón *NSE-hSMDF#1*^(+/-) que en sus hermanos de camada silvestres.

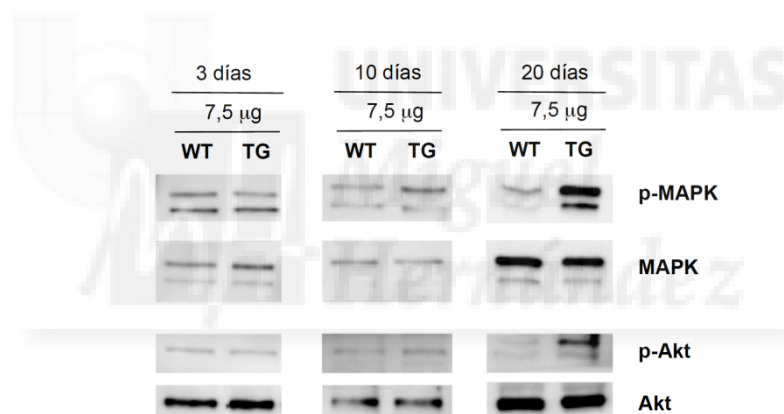


Figura R8: La sobre-expresión de SMDF activa las vías de la PI3K-Akt y MAPK. *Western blot* de extractos de nervio ciático a la edad de 3, 10 y 20 días incubados con los anticuerpos anti-fosfo-MAPK y anti-MAPK, o anti-fosfo-Akt y anti-Akt. Las señales de anti-MAPK y anti-Akt sirven como control de expresión y carga.

Del mismo modo que la vía de MAPK, el estado de activación de la vía de PI3K puede ser determinado mediante *Western blot*. En este caso estudiamos el grado de fosforilación de la proteína Akt, que es un efector de la PI3K. Del mismo modo que ocurre con la vía de RAS, el nervio ciático transgénico presenta mayores niveles de proteína Akt fosforilada que el nervio de los ratones silvestres de 20 días de edad. Sin embargo este aumento no es

tan notable como en el caso de la MAPK, y además no es claramente detectable hasta los 20 días de edad (figura R8).

En conjunto, el aumento de la cantidad de proteína MAPK y Akt fosforilada sugieren que ambas vías de señalización (MAPK y PI3K) se encuentran crónicamente estimuladas en los ratones transgénicos.

3.2. Efectos del transgén sobre la mielinización.

Durante el transcurso de los últimos años ha sido demostrado que la mielinización del SNP depende dramáticamente de la adecuada señalización entre neuronas y células de Schwann (Nave y Salzer 2006; Salzer 2008). Los axones exponen sobre su superficie determinadas proteínas que instruyen a las células de Schwann sobre que axón debe ser mielinizado. Hasta la fecha, la proteína de señalización más relevante identificada capaz de controlar el grado de mielinización ha sido la isoforma III- β 1 de la familia de las neuregulinas (Michailov, Sereda et al. 2004; Taveggia, Zanazzi et al. 2005). Para explorar si la otra neuregulina tipo III (la isoforma III- β 3) tiene también algún papel en la mielinización, estudiamos el estado de la capa de mielina en de los nervios periféricos de los ratones transgénicos *NSE-hSMDF#1^(+/-)*.

3.2.1. La expresión del transgén provoca una dramática caída de los niveles de mRNA que codifican para las proteínas de la mielina.

Para comprobar si la sobre-expresión de la neuregulina 1 tipo III β 3 (SMDF) provoca algún cambio a nivel de las proteínas de la mielina, en una primera aproximación determinamos los niveles de RNA mensajero que codifican para distintas proteínas de la mielina mediante PCR cuantitativa en el nervio ciático. Los niveles de RNA mensajero se midieron a diferentes edades P0, P3, P10, P20, P35 y P150 (tres muestras por edad). Los genes que utilizamos como testigos del grado de mielinización fueron los que codifican para la proteína cero de la mielina (P0) y la proteína básica de la mielina (MBP), que son dos proteínas exclusivas de la membrana de la mielina; también la proteína glial 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa), proteína específica de la glia y marcador de oligodendrocitos y células de Schwann; y la 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa (HMGCR),

enzima limitante en la síntesis de colesterol, fundamental para la formación de la membrana de mielina.

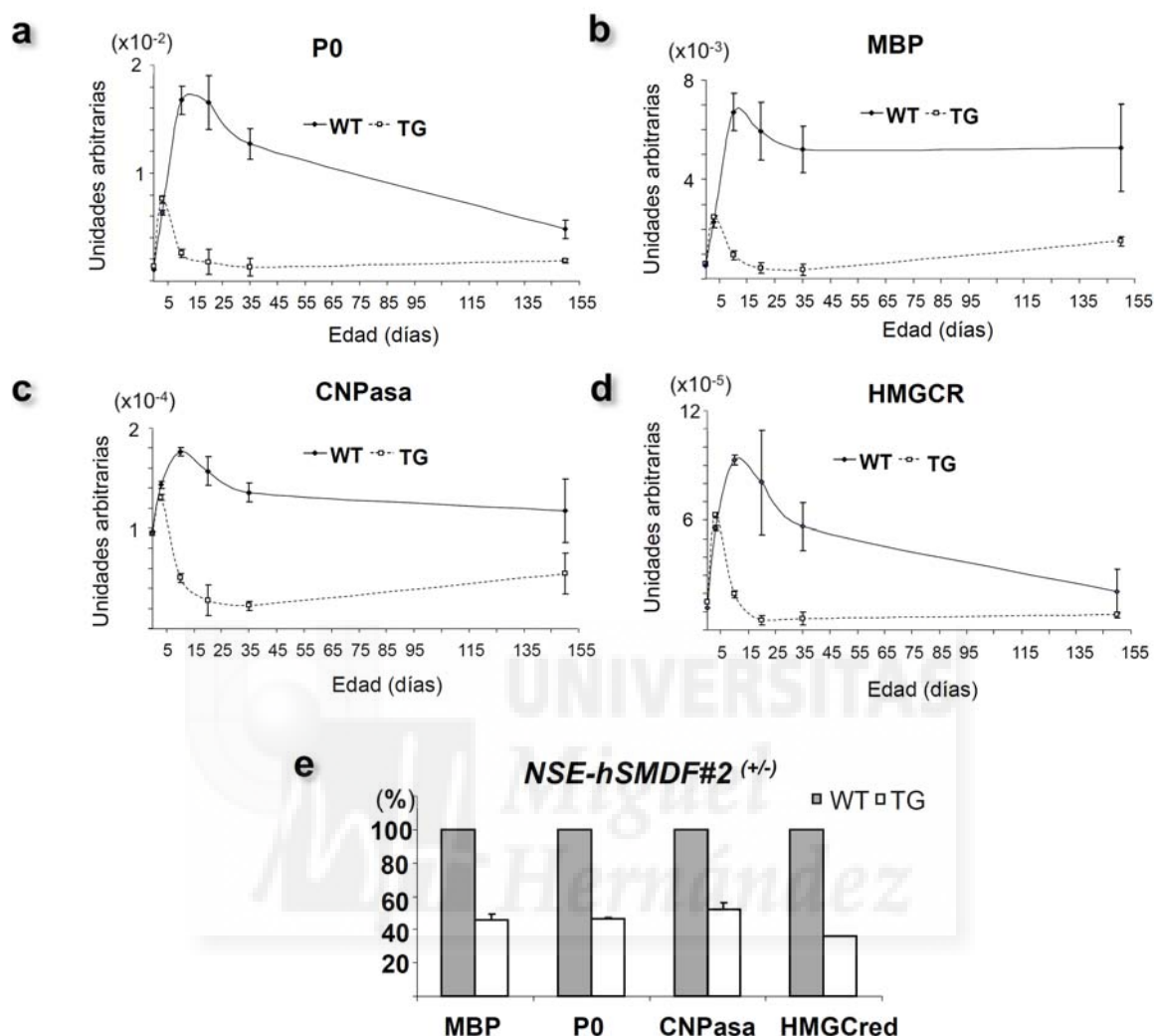


Figura R9: La sobre-expresión del transgén hSMDF en el nervio ciático de los ratones mutantes provoca una disminución de los mensajeros en los marcadores de mielinización. **a, b, c y d.** RT y qPCR de RNA mensajero de proteínas de la mielina (MBP, P0, CNPase y HMGCR), a partir de RNA obtenido de nervios ciáticos de ratones *NSE-hSMDF#1*^(+/-), a las edades P0, P3, P10, P20, P35 y P150 (n=3). **e.** En la línea *NSE-hSMDF#2*^(+/-), la expresión de estos genes a la edad de P20 disminuye a la mitad.

En la Figura R9 se representan los perfiles de expresión de estos mRNA durante el desarrollo postnatal (en unidades arbitrarias y normalizados al gen 18S) para las cuatro proteínas estudiadas. Como se aprecia en esta gráfica, durante los primeros días de desarrollo postnatal la cantidad de mensajero para la proteína P0 es parecido en ambos genotipos. En el ratón silvestre los niveles de mensajero para la proteína P0 suben hasta los 20 días de edad

(punto que corresponde con el pico de la mielinización del sistema nervioso periférico en los ratones), para experimentar a partir de ahí un descenso lento pero continuado. Por el contrario, en el ratón transgénico, el mRNA para la proteína P0 experimenta un notable descenso tras los 5 primeros días de vida, y se mantiene en niveles bajos durante todo el desarrollo postnatal hasta la edad adulta. Los otros genes implicados en la mielinización del sistema nervioso periférico: MBP, CNP y HMGR experimentan un perfil muy similar en ambos genotipos, sugiriendo una alteración general en el proceso de mielinización (Figura R9).

La disminución de los niveles de mensajero para estas proteínas podría ser consecuencia de la inserción aleatoria del transgén en una región del genoma del ratón importante para la regulación de la mielinización. Estos efectos posicionales los descartamos repitiendo las medidas de la PCR cuantitativa en la línea *NSE-hSMDF#2*^(+/-) a la edad de 20 días. Como se aprecia en la figura R9, la disminución de mRNA para las proteínas de la mielina a los 20 días de edad es también evidente. Aunque esta es una bajada notable (alrededor del 50% en los cuatro marcadores estudiados) sin embargo, es mucho menos pronunciada que en la línea *NSE-hSMDF#1*^(+/-), debido probablemente a que la expresión del transgén es 3,5 veces menor en línea #2.

3.2.2. Caída de los niveles de proteínas de la mielina en los ratones mutantes.

Para averiguar si los cambios en los niveles de mRNA son traducidos en una disminución de los niveles de proteínas de la mielina, determinamos la cantidad de MBP mediante la técnica de *Western blot*. Como se puede observar en la figura R10 el nervio ciático del ratón transgénico de 20 días de edad presenta mucha menos MBP que su hermanos silvestres. Los resultados indican que la disminución de RNA mensajero se traduce en una disminución en la cantidad de proteína MBP del $53 \pm 1,1\%$ respecto a los hermanos de camada silvestres ($p < 0.001$, prueba de t para una muestra, cuantificación realizada en 4 experimentos diferentes).

3.2.3. Relación entre los niveles de proteínas de mielina y el grosor de la capa de mielina.

La disminución en los niveles de RNA mensajero y proteínas de la mielina se observa generalmente en aquellas condiciones en las que la formación y crecimiento de las membranas de mielina está alterada. Para saber si esto es lo que ocurre en los nervios periféricos del ratón *NSE-hSMDF#1*^(+/-) determinamos el grosor medio de la capa de mielina en ratones transgénicos de 20 días de edad y sus hermanos de camada silvestres.

Para calcular el grosor medio de la capa de mielina utilizamos el *g-ratio* a partir de fotos digitalizadas tomadas en el microscopio electrónico en secciones transversales de nervio ciático. El *g-ratio* se determinó mediante la medida del perímetro del axón y el perímetro de la vaina de mielina de al menos 100 axones de cuatro ratones por genotipo.

Como se aprecia en la figura R10, la bajada en la expresión de las proteínas de la mielina no se traduce en una disminución en el grosor de la capa de mielina (expresada como el *g-ratio*). Así mientras el ratón silvestre tiene un *g-ratio* de $0,6705 \pm 0.004$, el ratón transgénico lo tiene de $0,6525 \pm 0.013$, diferencia insuficiente para tener significación estadística ($p=0.2803$).

En la figura R10d se puede observar la distribución de los axones por su tamaño frente al *g-ratio*. Mientras que ambas distribuciones presentan una correlación significativa entre diámetro de axón y *g-ratio* ($p < 0.001$ en ambos casos), sin embargo, los coeficientes de correlación para los animales silvestres y los transgénicos son significativamente diferentes (r de Pearson: 0.1743 en WT vs. 0.6040 en TG). Comparando entre ambos genotipos se observa que los axones de un tamaño mayor en el ratón mutante tienen un *g-ratio* mayor que los animales silvestres, esto nos indica que los axones de mayor tamaño del ratón TG están ligeramente hipomielinizados, aunque de una manera insuficiente para afectar a la media de los *g-ratios*.

Estos datos sugieren que la sobre-expresión de SMDF en las neuronas del sistema nervioso periférico provoca una reducción de los niveles de RNA mensajero y proteínas de la mielina, que no se corresponde con un déficit en la mielinización axonal.

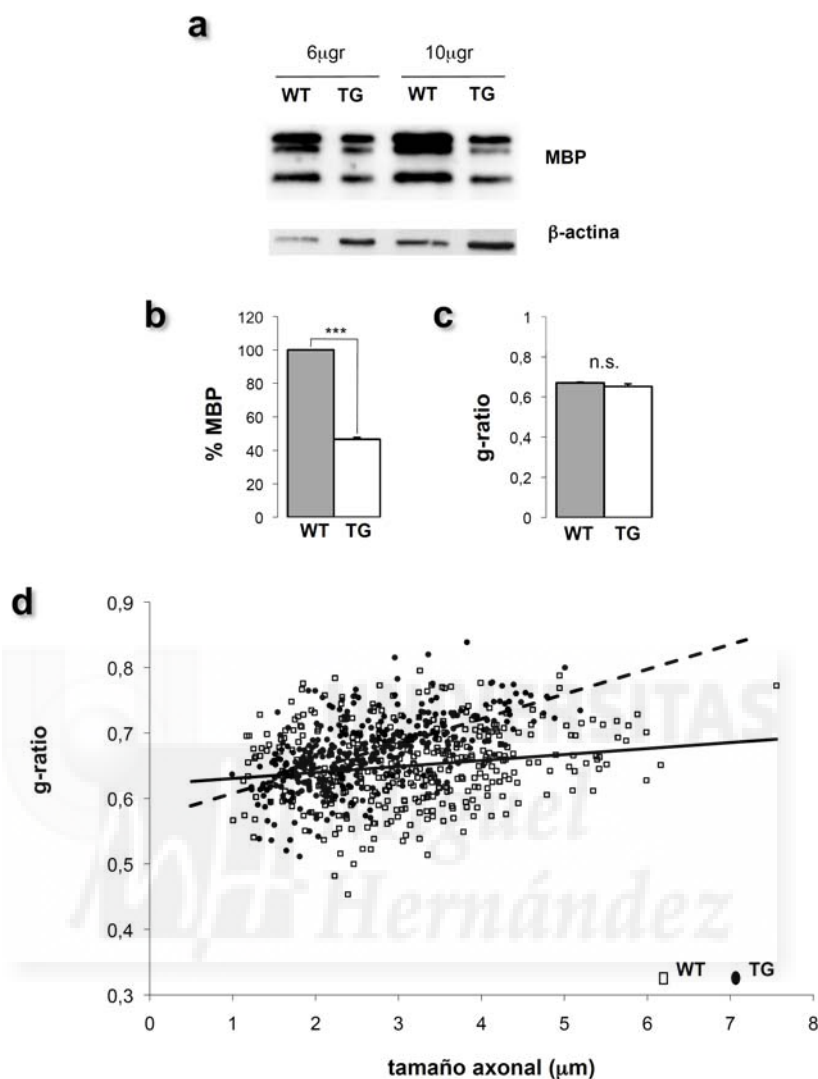


Figura R10: La disminución de mRNA se traduce en una disminución en la proteína MBP, que no resulta en un defecto en la mielinización de los axones **a**. *Western blot* de extractos de nervios ciáticos a P20, donde se observa una clara reducción de MBP en el ratón transgénico. La expresión de β -actina se usó como control de carga. **b**. Cuantificación de la disminución de los niveles de proteína MBP a partir de los resultados obtenidos en el *Western blot* ($p < 0.001$, prueba de t para una muestra, $n=4$). **c**. El grosor de la capa de mielina (medida como *g-ratio*) no presenta alteraciones entre los ratones transgénicos y silvestres a los 20 días de edad (prueba t de muestras independientes, $p=0.2803$ y $n=4$). **d**. Distribución de los *g-ratios* frente al tamaño de los axones (μ m). Mientras que ambas distribuciones presentan una correlación significativa entre diámetro de axón y *g-ratio* ($p < 0.001$ en ambos casos), los coeficientes de correlación son significativamente diferentes (r de Pearson: 0.1743 en WT, $n = 373$; vs. 0.6040 en TG, $n = 400$; $p < 0.001$).

3.3. La sobreactivación de la vía de las neuregulinas desregula el perfil de expresión de los factores de transcripción “maestros” que controlan el desarrollo de las células de Schwann y la mielinización.

La transición de célula de Schwann inmadura a célula de Schwann mielinizante depende de la regulación que sobre los genes de las proteínas de la mielina ejercen algunos factores de transcripción, que actúan como reguladores positivos o factores de transcripción “maestros”. Estos son Krox-20, Oct-6, Nab1 y 2, Brn2, NFκB, y Sox-10 (Topilko, Schneider-Maunoury et al. 1994; Bermingham, Scherer et al. 1996; Jaegle, Ghazvini et al. 2003; Nickols, Valentine et al. 2003; Le, Nagarajan et al. 2005; Ghislain y Charnay 2006).

Para determinar si el transgén modifica el perfil de expresión de algunos de estos factores, determinamos mediante qPCR los niveles (días) de mRNA de Krox-20, Oct6 y Sox10 desde el momento de nacimiento hasta los dos años de edad en los animales de la línea *NSE-hSMDF#1*^(+/-) y sus hermanos de camada silvestres.

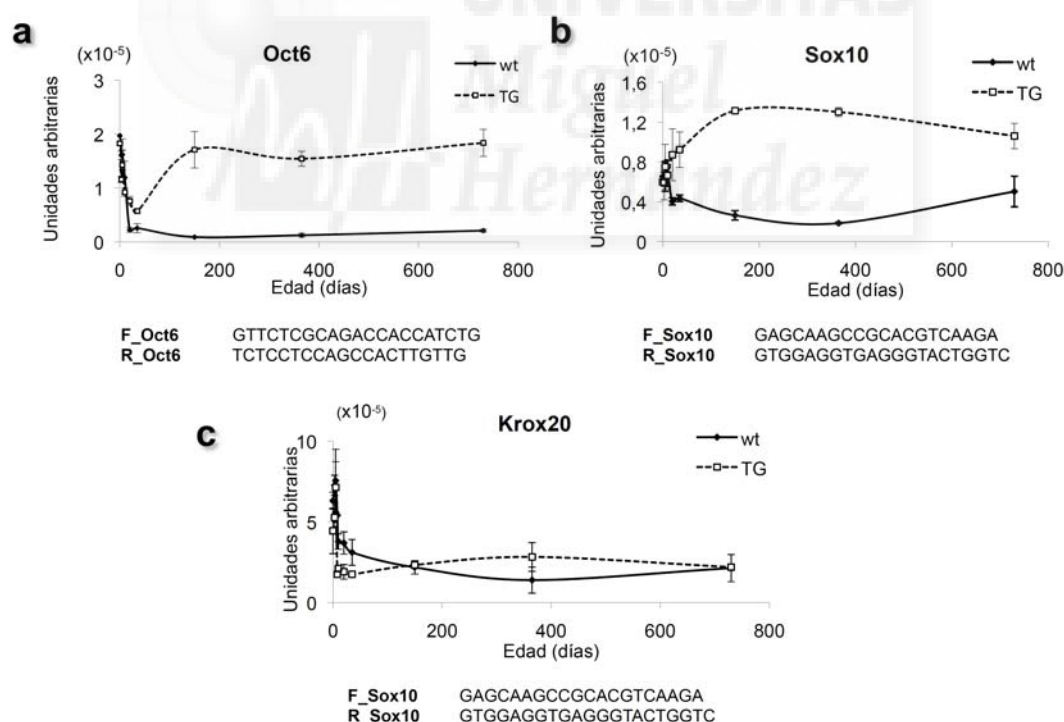


Figura R11: Efecto de la sobreactivación de la vía de las neuregulinas en el perfil de expresión de los factores de transcripción “maestros” en el proceso de mielinización. **a. y b.** Perfiles de expresión de Oct-6 y Sox10, que presentan diferencias con la edad entre genotipos. **c.** Perfil de expresión de Krox20, que tiene un perfil de expresión muy parecido en los dos genotipos. Acompañando a cada gráfica está la secuencia de los primers utilizados en la qPCR.

En la Figura R11 se representa el perfil de expresión de los niveles de RNA mensajero normalizados respecto al gen 18S para los tres factores de transcripción estudiados a las diferentes edades (se realizan tres cuantificaciones por edad y genotipo). Como se aprecia en esta figura, durante los primeros 35 días de desarrollo la cantidad de mensaje para Krox20, Oct-6 y Sox10 es muy semejante en los animales silvestres y los mutantes. Sin embargo, entre los días 10 y 20 de edad, en los animales transgénicos los niveles de Oct-6 y Sox10 experimentan un aumento, que los mantiene elevados hasta los dos años de edad. Este aumento de Oct-6 y Sox10 sugeriría una hipermielinización en los axones de los animales modificados genéticamente. Sin embargo, los niveles del factor de transcripción Krox-20, situado corriente abajo de Oct-6 y Sox10 (Svaren y Meijer 2008), no experimentan cambios significativos a ninguna de las edades estudiadas (Figura R11). Este último resultado concuerda con el hecho de que el transgén no provoca cambios reales en la mielinización de los axones.

3.4. Los ratones *NSE-hSMDF^(+/-)* muestran un notable engrosamiento de los nervios y ganglios periféricos.

Los animales transgénicos presentan un notable incremento en el grosor de los nervios periféricos (apreciable a simple vista en la disección). Esta alteración macroscópica es sobre todo evidente en la línea *NSE-hSMDF#1^(+/-)*, la cual expresa niveles mayores del mRNA codificado por el transgén. Como se aprecia en la figura R12, los ratones mutantes (P20) no solo presentan un incremento en el grosor de los nervios sino que tienen también engrosados los ganglios raquídeos y las raíces nerviosas.

3.4.1. El aumento del tamaño de los nervios es consecuencia de un incremento en el número de células de Schwann.

Puesto que la dramática disminución en los niveles de proteínas de la mielina en el ratón *NSE-hSMDF#1^(+/-)* no es causada por una alteración en la mielinización axonal, decidimos explorar otras causas que pudieran explicar este fenómeno. Como se acaba de comentar uno de los rasgos más característicos en estos animales es la presencia de unas raíces nerviosas y

ganglios periféricos notablemente engrosados (Figura R12), lo que podría estar causado por un aumento en el número de células en este tejido. Un hipotético aumento en el número de células (no mielinizantes) podría explicar (por un efecto de “dilución”) la disminución en los mensajeros y proteínas de la mielina observados. Para averiguar si esta hipótesis era correcta decidimos realizar un estudio detallado de la estructura histológica de los nervios ciático y vago de los ratones transgénicos.

3.4.1.1. Estudios en el nervio ciático.

Para averiguar si la hiperplasia de algún compartimento endoneurial pudiera tener un efecto de dilución capaz de explicar la bajada en estas proteínas, se realizó un estudio detallado a nivel microscópico del nervio periférico durante el desarrollo postnatal, desde recién nacido (P0) a cinco meses de edad (P150), tanto del ratón transgénico como de sus hermanos de camada silvestres. Para ello se utilizaron imágenes del microscopio óptico obtenidas a partir de secciones transversales de los nervios ciáticos incluidos en la resina epoxi y cortados en secciones semifinas (1-2 μ m), y posteriormente teñidos con azul de toluidina (Figura R12).

El aspecto microscópico de los nervios ciáticos de los animales transgénicos de hasta 5 días de edad es indistinguible del de sus hermanos de camada silvestres. Pero entre los 14 y 35 días de edad se observa una clara diferencia en el aspecto microscópico entre ambos genotipos: la densidad de axones es mucho menor, y parece existir una mayor cantidad de matriz extracelular y de células no asociadas a los axones en el ratón transgénico. Estas diferencias se suavizan a la edad de 150 días, donde la densidad de axones parece acercarse a la de los animales silvestres, así como el aspecto general del nervio.

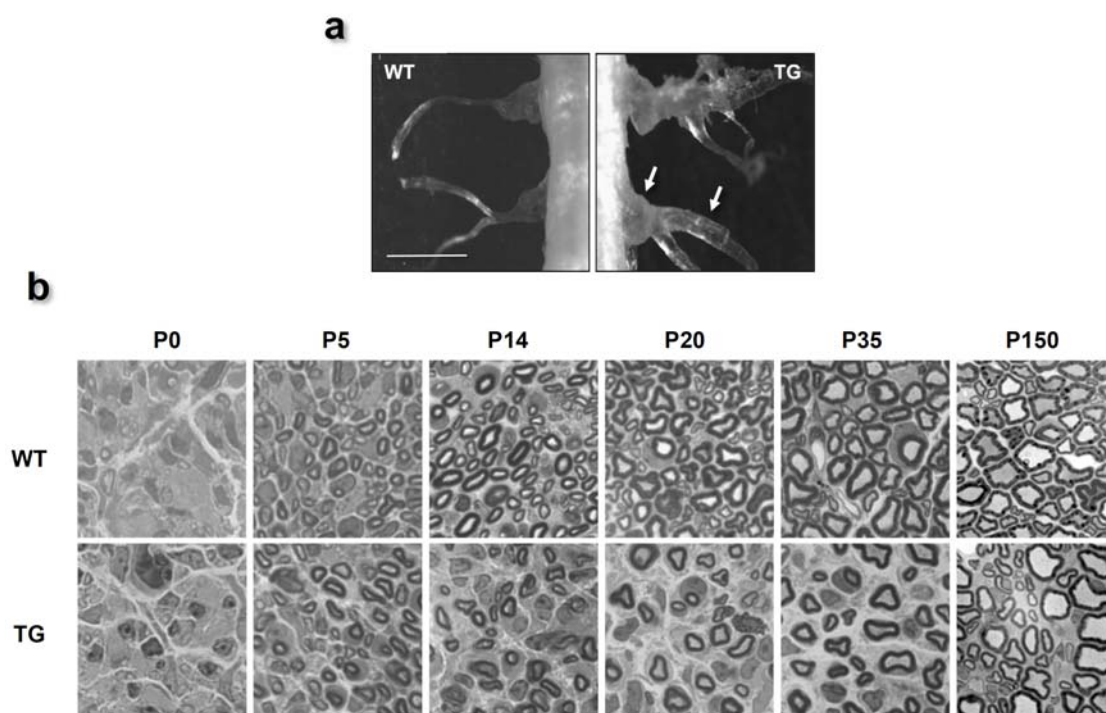


Figura R12: La expresión del transgén provoca un engrosamiento de los nervios periféricos y sus ganglios por un aumento del número de células de Schwann no mielinizantes. **a.** Ganglio raquídeo dorsal con sus respectivas raíces nerviosas en ambos genotipos, donde podemos apreciar un engrosamiento en los ganglios y raíces nerviosas del animal transgénico, marcados con flechas blancas (barra escala 100 μm). **b.** Nervios ciáticos en cortes semifinos (1-2 μm) teñidos con azul de toluidina. En las imágenes, tomadas con 60x a diferentes edades, se aprecian diferencias a partir de P14 en la densidad de axones por sección y el número de células de Schwann disociadas de los axones.

3.4.1.1.1. Evolución temporal del diámetro nervioso y número de células durante el desarrollo postnatal.

Para cuantificar el engrosamiento y el incremento en el número de células presentes en los nervios ciáticos mutantes utilizamos imágenes de secciones transversales del nervio obtenidas en el criostato. Para estimar la cantidad de células, teñimos los núcleos con el colorante bisbenzimidida, (tinción de Hoechst), que emite fluorescencia al ser excitado por luz UV cuando está unido al DNA. A partir de imágenes obtenidas en el microscopio confocal, calculamos el área de la sección transversal del nervio y el número de núcleos por sección en un único plano (y por tanto la densidad de núcleos) para cada genotipo en diferentes momentos del desarrollo postnatal (figura R13a).

En los ratones *NSE-hSMDF#1*^(+/-) se observa que el área de la sección del nervio ciático sufre un aumento. Este se produce de una manera tardía después del nacimiento, ya que a los 5 días de edad los nervios ciáticos tienen aproximadamente el mismo área en ambos genotipos, (los ratones silvestres tienen $63 \pm 4 \times 10^3 \text{ mm}^2$ y los ratones transgénicos $64 \text{ mm}^2 \pm 1 \times 10^3 \text{ mm}^2$ (n=3)). Pero a los 20 días el área de la sección del transgénico es 1,9 veces superior a la del ratón silvestre. El ratón mutante muestra un área de $221 \pm 1 \times 10^3 \text{ mm}^2$ frente a $116 \pm 7 \times 10^3 \text{ mm}^2$ del área del ratón silvestre (n=5). Sin embargo, el área tiende a igualarse con la edad. Así, a la edad de 150 días los ratones silvestres tienen un área de $261 \pm 2 \times 10^3 \text{ mm}^2$ (n=2) y los ratones transgénicos $297 \pm 1 \times 10^3 \text{ mm}^2$ (n=2). En la figura R13b se representa el perfil del área de la sección del nervio en cada genotipo durante el desarrollo postnatal.

La celularidad del nervio (el número de núcleos por sección) se comporta de una manera semejante. Así a los 5 días de edad (figura R13c), hay un número similar de núcleos por sección: ratón silvestre 460 ± 30 núcleos/sección y el transgénico 500 ± 6 núcleos/sección (n=3). Pero a los 20 días el número de núcleos en el ratón transgénico es 3,7 veces mayor al ratón silvestre (el silvestre tiene 530 ± 30 núcleos/sección y el transgénico 1.860 ± 90 núcleos/sección, n=5). Al contrario que en el caso del área, los núcleos por sección no se igualan con la edad; a los 150 días de edad en el silvestre hay 550 ± 20 núcleos/sección frente a 1580 ± 30 núcleos/sección del transgénico.

En la figura R13d se puede observar la evolución de la densidad de núcleos por sección, a la edad de 5, 20 y 150 días en el ratón mutante y el silvestre. La densidad de los núcleos en el nervio ciático de los ratones silvestres disminuye desde los 5 días de edad hasta que la mielinización se completa, a los 20 días de edad. Esto es probablemente consecuencia del engrosamiento de la vaina de mielina. Pero en el caso de los ratones transgénicos, ocurre todo lo contrario: a los veinte días de edad la densidad de núcleos presenta un pico máximo. A partir de los 20 días de edad, la caída en la densidad de núcleos tanto en el ratón silvestre como en el transgénico es parecida.

En la línea de *NSE-hSMDF#2*^(+/-) los resultados observados son similares (Figura R13e). En la sección transversal de los ciáticos de los ratones

transgénicos (P20) hay 1,5 veces más núcleos que en las secciones de los animales silvestres (502 ± 10 núcleos/sección en el silvestre y 775 ± 24 núcleos/sección en el transgénico, $n=2$). La densidad de núcleos por área también es superior en el nervio transgénico (es de 484 ± 21 núcleos/ mm^2 y 677 ± 34 núcleos/ mm^2 en el silvestre y mutante respectivamente, $n=2$). Los ratones silvestres tienen un área de sección transversal de $104 \pm 1 \times 10^3 \text{ mm}^2$ frente $114 \pm 4 \times 10^3 \text{ mm}^2$ de los animales transgénicos ($n=2$). Este es el único parámetro que no presenta un valor tan diferente respecto al control. Estos resultados sugieren que un incremento del 50% en el número de células es insuficiente para reflejarse en un aumento en el área de la sección.

En la figura R13d se puede observar la evolución de la densidad de núcleos por sección, a la edad de 5, 20 y 150 días en el ratón mutante y el silvestre. La densidad de los núcleos en el nervio ciático de los ratones silvestres disminuye desde los 5 días de edad hasta que la mielinización se completa, a los 20 días de edad. Esto es probablemente consecuencia del engrosamiento de la vaina de mielina. Pero en el caso de los ratones transgénicos, ocurre todo lo contrario: a los veinte días de edad la densidad de núcleos presenta un pico máximo. A partir de los 20 días de edad, la caída en la densidad de núcleos tanto en el ratón silvestre como en el transgénico es parecida.

En la línea de *NSE-hSMDF#2*^(+/-) los resultados observados son similares (Figura R13e). En la sección transversal de los nervios ciáticos de los ratones transgénicos (P20) hay 1,5 veces más núcleos que en las secciones de los animales silvestres (502 ± 10 núcleos/sección en el silvestre y 775 ± 24 núcleos/sección en el transgénico, $n=2$). La densidad de núcleos por área también es superior en el nervio transgénico (es de 484 ± 21 núcleos/ mm^2 y 677 ± 34 núcleos/ mm^2 en el silvestre y mutante respectivamente, $n=2$). Los ratones silvestres tienen un área de sección transversal de $104 \pm 1 \times 10^3 \text{ mm}^2$ frente $114 \pm 4 \times 10^3 \text{ mm}^2$ de los animales transgénicos ($n=2$). Este es el único parámetro que no presenta un valor tan diferente respecto al control. Estos resultados sugieren que un incremento del 50% en el número de células es insuficiente para reflejarse en un aumento en el área de la sección.

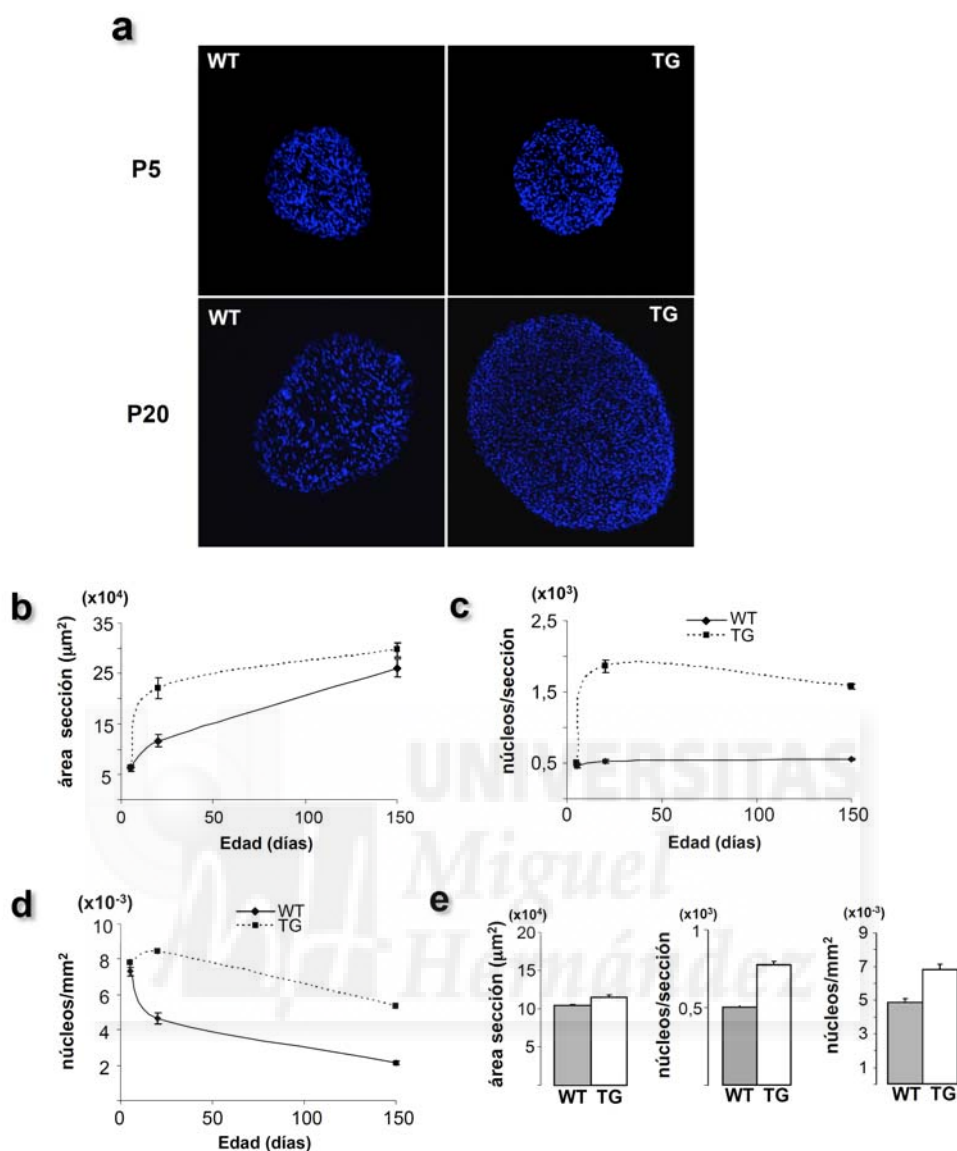


Figura R13: Diferencias entre los nervios ciáticos provocadas por la expresión de hSMDF. **a.** El número de núcleos teñidos con Hoechst es igual en el ratón silvestre y transgénico a P5, mientras que a P20 se observa una gran diferencia, con un número de núcleos mucho mayor en los ratones transgénicos. **b.** Evolución de la sección del nervio ciático durante el desarrollo postnatal. **c.** El incremento del número de núcleos teñidos con Hoechst en el ratón *NSE-hSMDF#1*^(+/-) se mantiene con la edad. **d.** El ratón transgénico en los primeros días de desarrollo no presenta una disminución en la densidad de núcleos, por lo contrario presenta un aumento. A partir de P20 la disminución es la misma en ambos genotipos. **e.** El ratón *NSE-hSMDF#2*^(+/-) a P20 presenta unas características parecidas a la línea #1, a excepción del área del nervio, donde el aumento en el ratón transgénico es de solo 1,1 veces.

3.4.1.1.2. La hipercelularidad es consecuencia de la expansión de la población de las células de Schwann no mielinizantes (GFAP+).

Como se ha visto, el aumento en el grosor de los ganglios y nervios se debe a un aumento de la celularidad en los nervios de los animales transgénicos. Los nervios periféricos están formados mayoritariamente por los axones de las neuronas sensoriales y motoras y las células de Schwann, que representan más del 95% de las células nucleadas en los nervios. Además, existen otras células como son los fibroblastos, células del sistema inmune y adipocitos.

Para estudiar qué tipo de células son las que han proliferado determinamos los niveles de proteínas marcadoras del linaje de las células de Schwann. En primer lugar realizamos un *Western blot* frente a la proteína erbB3, que es un receptor de neuregulinas expresado en células de Schwann, tanto mielinizantes como no mielinizantes (Jessen y Mirsky 2005), pero no en otros tipos celulares del sistema nervioso periférico. Como se muestra en la figura R14a, hay incluso un aumento de la cantidad de la banda correspondiente a erbB3 en los ratones transgénicos, sugiriendo que la mayor parte de las células que han proliferado son células de Schwann, y no otros tipos celulares, los cuales *a priori* diluirían la señal para erbB3. Para distinguir entre las células de Schwann mielinizantes y las no mielinizantes, realizamos un *Western blot* frente a la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP), marcador que se expresa en las células de Schwann no mielinizantes y está ausente en las mielinizantes (Jessen, Morgan et al. 1990). Como se observa en la figura R14a, la proteína GFAP está notablemente sobre-expresada en los nervios transgénicos, sugiriendo que la fracción celular aumentada es la de células de Schwann no mielinizantes. Obtuvimos resultados similares con la apolipoproteína E (apoE), que al igual que GFAP está presente en las células de Schwann no mielinizantes y ausente en las células mielinizantes (Boyles, Pitas et al. 1985). Estos datos sugieren que existe un incremento en la celularidad a consecuencia de la expansión del número de células de Schwann no mielinizantes. Esta hipótesis se refuerza al observar cortes semifinos del nervio ciático teñidos con azul de toluidina (figura R14b). En los ratones

transgénicos existe un mayor número de células no asociadas a axones (marcadas con asterisco), que son probablemente células de Schwann no mielinizantes. Por el contrario en los ratones silvestres casi no se observan células no asociadas a los axones.

Para comprobar si las células que han proliferado en el nervio transgénico son realmente células de Schwann no mielinizantes, realizamos una inmunofluorescencia (en cortes longitudinales de nervios ciáticos) utilizando los anticuerpos anti-S100 (para identificar células de Schwann) y anti-GFAP (que marca exclusivamente las células de Schwann no mielinizantes). Las células de Schwann no mielinizantes, marcadas con GFAP, se ven en color rojo y en verde las células marcadas con S100 β (Figura R14c). En la imagen del ciático del ratón silvestre se puede apreciar que las células mielinizantes (positivas para S100 y negativas para GFAP) ocupan la mayor parte del tejido. Además los núcleos son alargados como consecuencia del empaquetamiento que sufren después de mielinizar el axón. Sorprendentemente en el ratón transgénico las fibras mielinizadas (S100 positivas) están separadas por grupos de células de Schwann no mielinizantes, GFAP positivas, y con los núcleos redondeados al no sufrir el empaquetamiento experimentado por las células mielinizantes.

Estos resultados demuestran claramente que existe un aumento en el número de células no mielinizantes, pero no nos dan información sobre las mielinizantes. Para ver si hay algún cambio en el número de células de Schwann mielinizantes, realizamos una inmunohistoquímica de cortes longitudinales del nervio ciático de 20 días de edad con el anticuerpo anti-Krox20. Como se ha comentado antes, Krox20 es un factor de transcripción cuya expresión inicia el programa de diferenciación y mielinización en las células de Schwann. Como se aprecia en la figura R14d no se ve una diferencia en el número de células mielinizantes por unidad de longitud del nervio entre los animales silvestres y transgénicos. El número de células Krox20 positivas por sección del nervio son parecidos en los animales silvestres ($100 \pm 19\%$) y en los transgénicos ($108 \pm 16\%$) ($n=3$).

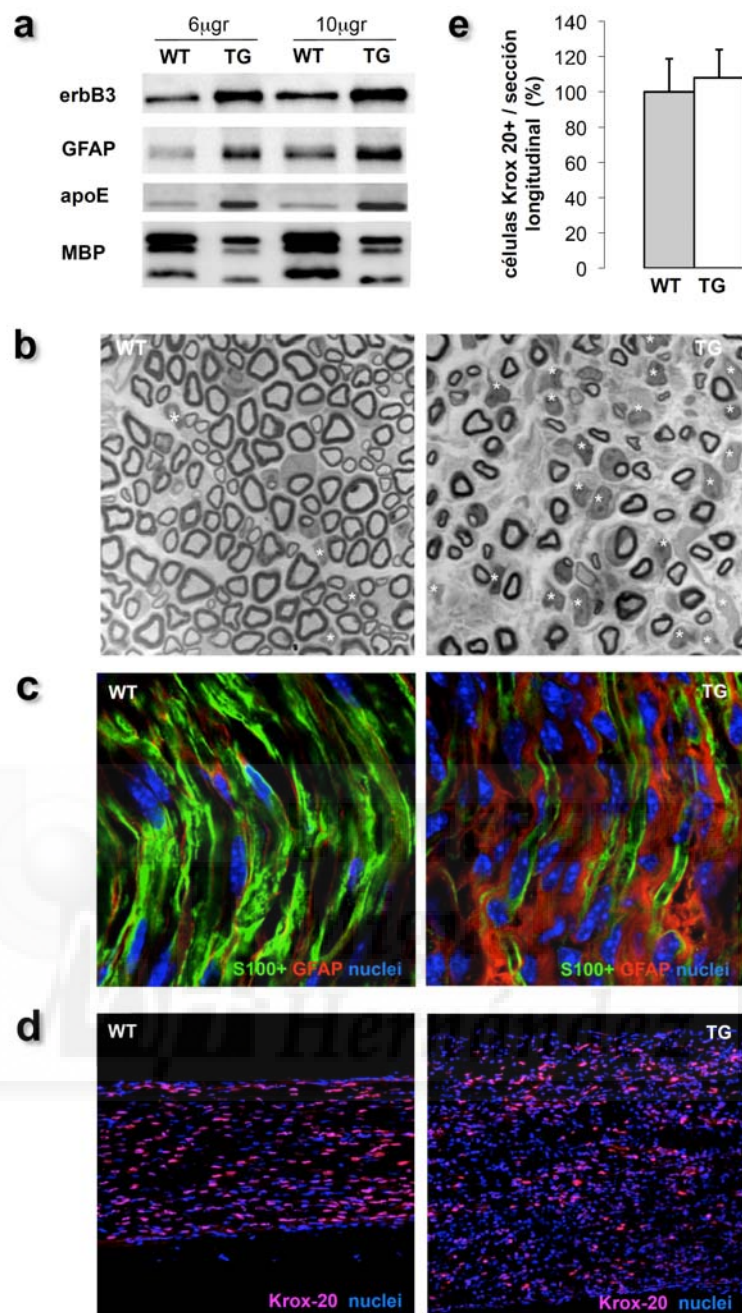


Figura R14: Incremento celular debido a la proliferación de las células de Schwann no mielinizantes (nmSC). **a.** El marcador de células de Schwann, la proteína erbB3, está aumentada en los ratones transgénicos, al igual que la proteína GFAP y apoE, marcadores de células de Schwann no mielinizantes (nmSC). **b.** Secciones de nervio ciático teñidas con azul de toluidina, donde se observa que el número de células no asociadas a axones es superior en el ratón transgénico (marcadas con un asterisco). **c.** En los nervios de los ratones *NSE-hSMDF#1^(+/+)* las nmSC (que son GFAP⁺, en rojo), se observan formando agrupaciones alrededor la fibras mielinizadas S100⁺ (en verde). **d y e.** El número de células mielinizantes (Krox20⁺) no está aumentado en los animales transgénicos. Aunque la densidad de células Krox20⁺ está claramente disminuida en los nervios transgénicos, el número de células positivas por sección longitudinal de nervio es similar en ambos genotipos (prueba *t* de muestras independientes, $p=0.1203$ y $n=3$).

Aparte del incremento en el número células que han proliferado en el nervio, un incremento en el número o un aumento en el volumen de los axones puede estar contribuyendo al engrosamiento de los nervios en los ratones transgénicos. Para ver si también hay diferencias en estos dos aspectos, realizamos la medida de la densidad axonal a los 5, 14, 20 y 150 días de edad en los ratones *NSE-hSMDF#1* y sus hermanos silvestres de camada. Como se aprecia en la figura R15a, la densidad de axones a los cinco días de edad es la misma en ambos genotipos, sin embargo, a los 20 días de edad la densidad en los ratones transgénicos baja al $60,9 \pm 7,6\%$ respecto a los ratones silvestres. Sin embargo, si multiplicamos la densidad de los axones por la diferencia en el área de sección (1,9 veces mayor en el transgénico) se obtiene que el número de axones por nervio es muy similar en los animales transgénicos y silvestres ($115 \pm 14\%$ en el transgénico, respecto al silvestre).

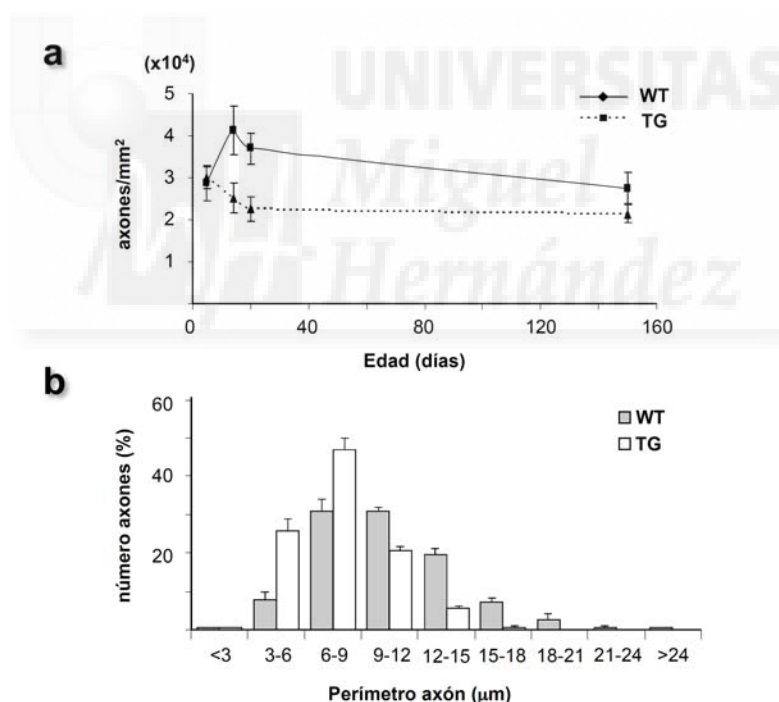


Figura R15: El tamaño axonal no contribuye al aumento del área de la sección del nervio en los ratones mutantes **a**. La disminución de la densidad axonal está compensada por el incremento en el área, no existiendo de cambios en el número de axones por sección. **b**. La distribución del perímetro axonal está desplazada en los nervios mutantes hacia perímetros más pequeños, apoyando la tesis de que estos no contribuyen al engrosamiento de los nervios.

Para explorar la posible contribución del incremento del tamaño axonal en el engrosamiento del nervio realizamos la medida del perímetro axonal en los animales *NSE-hSMDF#1* y hermanos silvestres. Como se puede apreciar en la figura R15b, la distribución del perímetro de los axones está desplazada en los nervios mutantes, hacia perímetros más pequeños. Por lo tanto concluimos que ni el aumento del tamaño de los axones, ni el aumento en su número contribuyen al engrosamiento del nervio ciático observado en los animales mutantes.

3.4.2. Estudios en el nervio vago.

Para comprobar si los efectos de la sobreexpresión del transgén observados eran exclusivos para el nervio ciático o por el contrario ocurrían también en otras partes del sistema nervioso periférico, realizamos estudios en el nervio vago (figura R16).

Tanto el área como el número de células por sección del vago en los animales modificados genéticamente (P20) es mayor que la de sus hermanos de camada silvestres. Como se puede observar en la figura R16 (a y c), la sección del nervio vago es 5,9 veces superior que la del silvestre (los animales transgénicos tienen un área transversal de $18,6 \pm 0,1 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ y los silvestres de $109,7 \pm 7,9 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$, $n=3$). Igual sucede con el número de núcleos por sección, que es 5,3 veces superior en los animales modificados genéticamente (en estos hay $1,6 \pm 0,044 \times 10^3$ núcleos/sección, mientras en el silvestre hay $0,3 \pm 0,001 \times 10^3$ núcleos/sección, $n=3$). La densidad de núcleos, es sin embargo, igual en ambos genotipos ($15,2 \pm 0,1 \times 10^3$ núcleos/ mm^2 en los silvestres y $15,1 \pm 0,8 \times 10^3$ núcleos/ mm^2 en los transgénicos, $n=3$). Esto es posiblemente consecuencia de que, a diferencia del nervio ciático, la mayor parte de los axones del nervio vago no se mielinizan.

En conjunto estos datos nos sugieren que la sobre-expresión neuronal de SMDF provoca un incremento generalizado en el número de células de Schwann no mielinizantes a lo largo de todo el sistema nervioso periférico.

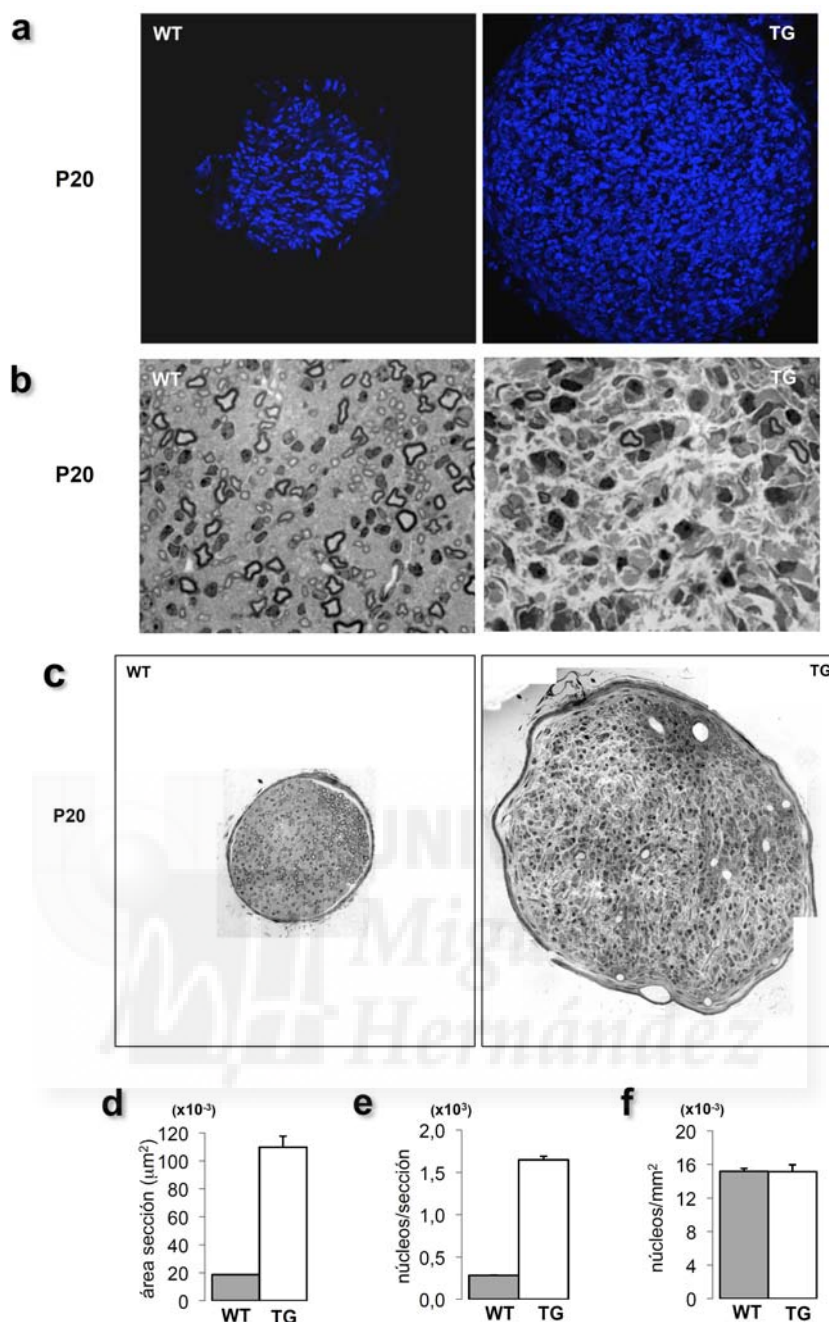


Figura R16: Diferencias entre los nervios vagos silvestre y transgénico provocados por la sobreexpresión de hSMDF. **a.** En el número de núcleos teñidos con Hoechst a P20 se observa una gran diferencia, al igual que en el tamaño de la sección transversal del nervio vago. **b.** Secciones de nervio vago teñidas con azul de toluidina, donde se observa que el número de células no asociadas a axones es superior en el ratón transgénico. **c.** Imágenes de los nervios vagos silvestre y transgénico, donde se aprecia que la diferencia de tamaño a los 20 días de edad. **d.** El área del nervio vago en ratón transgénico es 5,9 veces superior al ratón silvestre. **e.** El número de núcleos por sección es de 5,3 veces superior en el transgénico **f.** A diferencia de lo que ocurre en el ciático, la densidad de núcleos en ambos genotipos es la misma.

3.5. El aumento en la proliferación celular explica la hiperplasia en los nervios periféricos.

El aumento en el número de células en los nervios de estos ratones transgénicos podría ser debido a un incremento en su proliferación, a una disminución en su muerte, o una combinación de ambos efectos. Puesto que la muerte celular (apoptosis) es ya casi indetectable en los nervios después de P5 (Grinspan, Marchionni et al. 1996), sería muy difícil explicar como una disminución de algo que es ya de por sí muy bajo, puede provocar el incremento masivo en el número de células que experimentan estos nervios entre P5 y P20. Por este motivo nos centramos en determinar si existe un incremento en la proliferación de las células de Schwann en los nervios transgénicos.

Para conocer el número de células que proliferan utilizamos el ensayo de incorporación del 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). El BrdU es un nucleótido sintético análogo de la timidina. Esta analogía permite una sustitución casi total (entre el 99.8 y el 100%) de los nucleótidos de timidina en las células que han entrado en fase de síntesis. En ratones de 5 y 14 días de edad se inyectó BrdU (50mg/Kg) por vía intraperitoneal en cuatro inyecciones, cada 2 horas. Transcurridas dos horas de la última inyección, los ratones se sacrificaron y se disecaron los nervios ciáticos. Estos se sometieron a disgregación mecánica con el bisturí, y una posterior disociación enzimática con colagenasa A durante dos horas. Después se sembraron las células sobre un cristal previamente tratado con poli-L-lisina hasta su adhesión al sustrato (unas 12 horas). Al día siguiente realizamos una inmunofluorescencia de las células plaqueadas con los anticuerpos anti-BrdU (células que han atravesado la fase de síntesis) y anti-S100 (marcador células de Schwann). La fracción proliferativa se calculó al dividir el número de células S100/BrdU⁺ por el de S100⁺. Como se aprecia en la figura R17, los nervios ciáticos de los ratones transgénicos de 5 días presentan un claro incremento en la fracción proliferativa de células de Schwann (incremento de 2,4 veces, prueba *t* de muestras independientes, $n=3$ y $p<0.0001$). Sin embargo, a los 14 días de edad no existen diferencias significativas entre ambos genotipos. Nuestros resultados demuestran que la hiperplasia de los nervios ciáticos en los animales transgénicos se debe

fundamentalmente a la hiperproliferación de las células de Schwann no mielinizantes antes de P14.

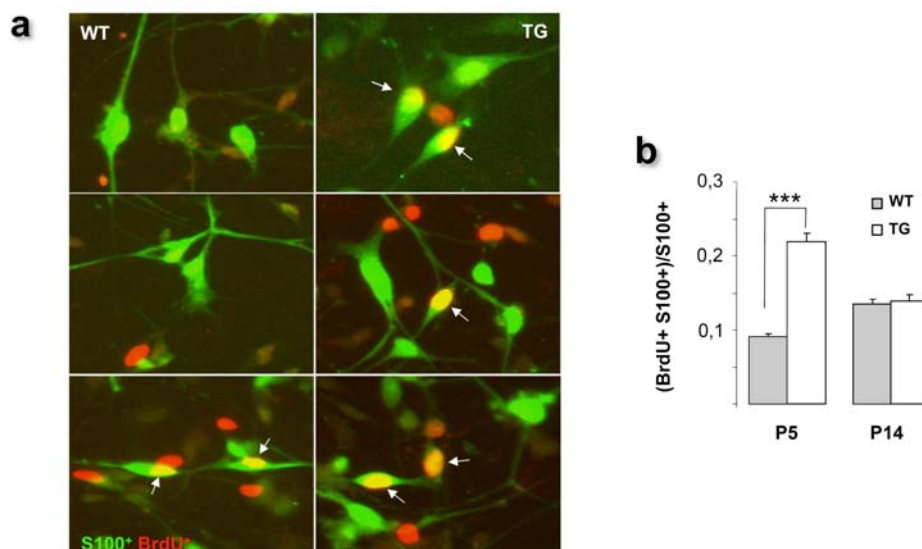


Figura R17: Proliferación incrementada de las células de Schwann en los ratones mutantes **a.** Experimento de proliferación celular con BrdU (50mg/kg) en células de Schwann disgregadas de los nervios ciáticos del ratón. Las células marcadas con BrdU/S100⁺ fueron contadas y normalizadas frente al número de células S100⁺. **b.** Se observa un incremento en la proliferación a los cinco días ($p < 0.0001$) en el ratón *NSE-hSMDF#1*^(+/-), mientras que a los catorce días no hay diferencias significativas ($p = 0,8091$).

Para confirmar los resultados obtenidos decidimos utilizar una segunda aproximación. En este caso marcamos las células que están en fase de mitosis mediante anticuerpos para la forma fosforilada de la histona H3 (pH3) en secciones longitudinales de los nervios ciáticos (figura R18a). El anticuerpo utilizado reconoce específicamente la fosforilación en la serina 10 de la histona H3. Esta serina se fosforila solo durante la mitosis. La fosforilación está relacionada con la condensación del cromosoma durante esta fase del ciclo celular y es un evento considerado crucial para su inicio.

Al igual que sucede con los experimentos de BrdU, el número de células pH3 positivas a la edad de 5 días es mayor en el ratón transgénico que en el silvestre, (en un 35%, prueba *t* de muestras independientes, $n = 3$ y $p < 0,0001$). Por el contrario a la edad de 14 días hay un número similar de células en mitosis en los dos genotipos (figura R18b). Por lo tanto estos datos confirman los obtenidos con BrdU y sugieren que el aumento en la proliferación de las

células de Schwann sucede principalmente durante los primeros 14 días de edad en los ratones transgénicos.

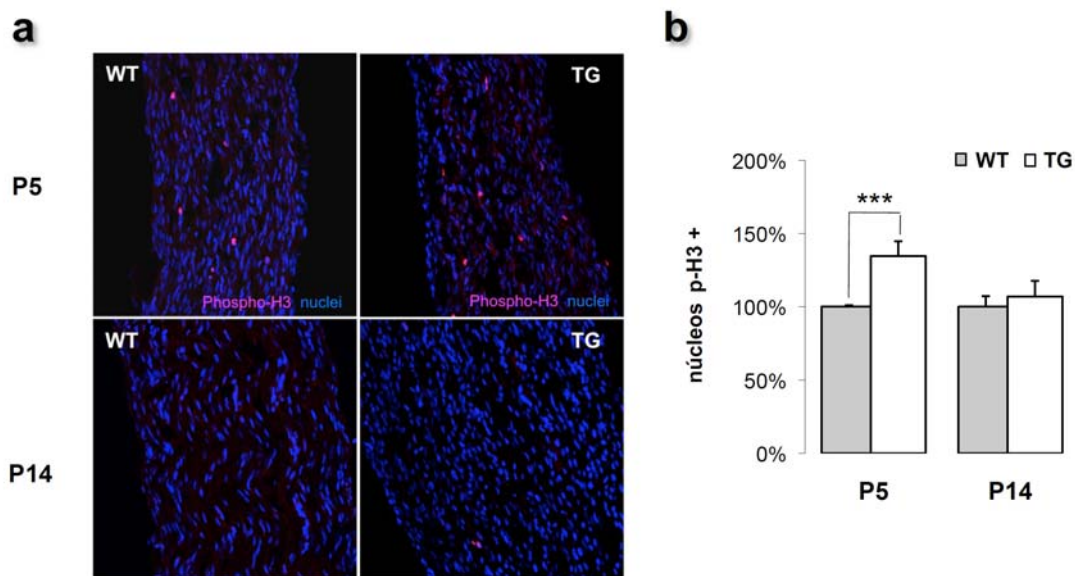


Figura R18: Aumento en la proliferación de las células de Schwann en el nervio ciático del ratón transgénico. Se utilizó como marcador de mitosis la forma fosforilada de la histona H3 (pH3, en púrpura). **a.** Inmunofluorescencia de cortes longitudinales del nervio con pH3 a la edad de cinco y catorce días. **b.** El incremento de proliferación celular medido como pH3+ se produce a la edad de cinco días ($p < 0,0001$, $n=3$), no observándose diferencia a los catorce días de edad.

3.6. Desorganización y mielinización de los haces de *Remak* en los ratones *NSE-hSMDF*^(+/-).

Un haz de *Remak* (*Remak bundle*) está formado por una célula de Schwann no mielinizante rodeando a varios axones de pequeño calibre, menores de $1\mu\text{m}$ de diámetro. Debido a su pequeño diámetro estos axones quedan sin mielinizar, pero separados unos de otros por el citoplasma de la célula de Schwann no mielinizante. Los haces de *Remak* son el correlato morfológico de las fibras C de los registros electrofisiológicos, y están implicados en la transmisión del impulso doloroso, la sensación térmica y el picor entre otros. Los axones en estos haces están rodeados de manera independiente por el citoplasma de la célula de Schwann que los segrega, formando “bolsillos” (*pockets*) individuales donde se sitúa, en la inmensa mayoría de los casos, un único axón (Figura R19 a y b). En 2005, Taveggia y colaboradores sugirieron que la segregación de los axones en los *Remak bundles* está controlada por las neuregulinas 1 de tipo III.

3.6.1. Los axones de los haces de *Remak* mutantes contactan físicamente unos con otros.

Durante el desarrollo de nuestro estudio observamos, en imágenes de microscopía electrónica del nervio ciático, que el ratón *NSE-hSMDF#1*^(+/-) presenta los haces *Remak* notablemente alterados. Curiosamente todos los axones del haz están empaquetados en un único “bolsillo” sin existir citoplasma de la célula de Schwann entre ellos (Figuras R19).

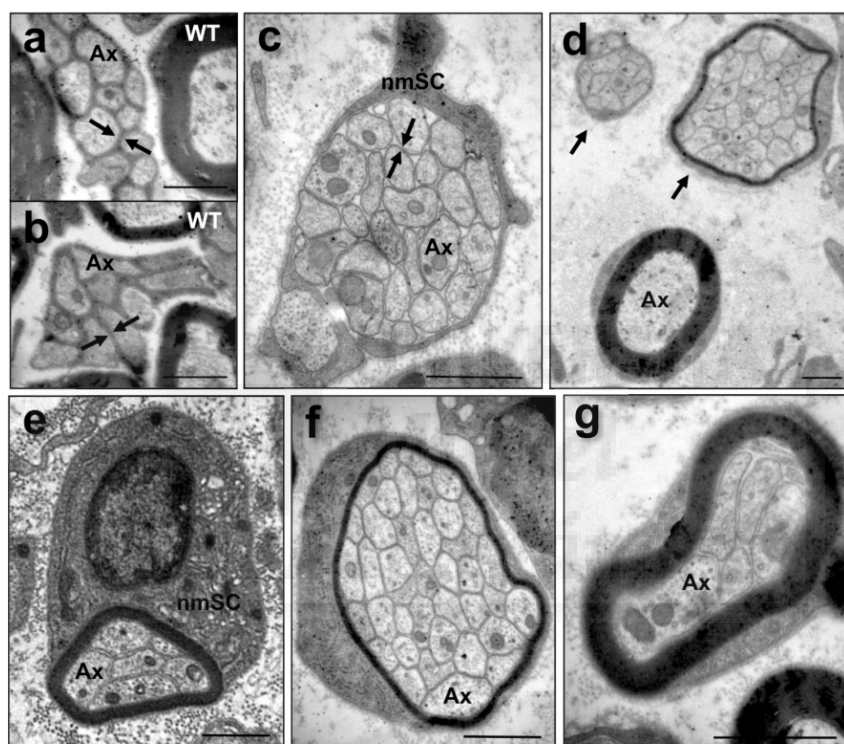


Figura R19: La sobre-expresión de hSMDF altera el desarrollo normal de los *Remak bundles*. **a y b** Imagen de microscopía electrónica de un *Remak bundle* silvestre. Se puede apreciar como el citoplasma de la nmSC rodea a los axones de pequeño calibre segregados (indicado por las flechas). **c.** *Remak* en el ratón *NSE-hSMDF#1*^(+/-) donde se observa que los axones no están segregados, y el citoplasma de la nmSC está solamente alrededor del haz de axones (flechas). **d.** Los dos tipos de *Remak* que se pueden observar en el ratón *NSE-hSMDF#1*^(+/-), el *Remak* con los axones sin segregar y el *Remak* sin segregar con una capa electrón-densa rodeando a todo el paquete de axones. **e, f y g.** Diferentes *Remak bundles* rodeados por la capa electrodensa donde se puede apreciar que esta capa es indistinguible de la mielina que rodea a los axones de mayor diámetro.

Una cuantificación detallada de este fenotipo se puede observar en la figura R19. Como podemos ver hay un incremento dramático en el número de axones por bolsillo en el ratón transgénico. Mientras que en el ratón silvestre el 94,18 ± 2,7% de los axones están en un bolsillo único, en los ratones transgénicos el porcentaje es de tan solo el 7,67 ± 2,9% ($p < 0,0001$, $n=4$). Además mientras que en los animales mutantes hay bolsillos con más de 10 axones, incluso hasta 48 axones por bolsillo, en los animales silvestres nunca se encuentran bolsillos con un número tan elevado de axones.

Aunque la distribución del número de axones por bolsillo es diferente, la distribución del número de axones por *Remak bundle* no está prácticamente modificado (figura R20). Tan solo en la cantidad de *Remak bundles* con más de 41 axones existen ligeras diferencias.

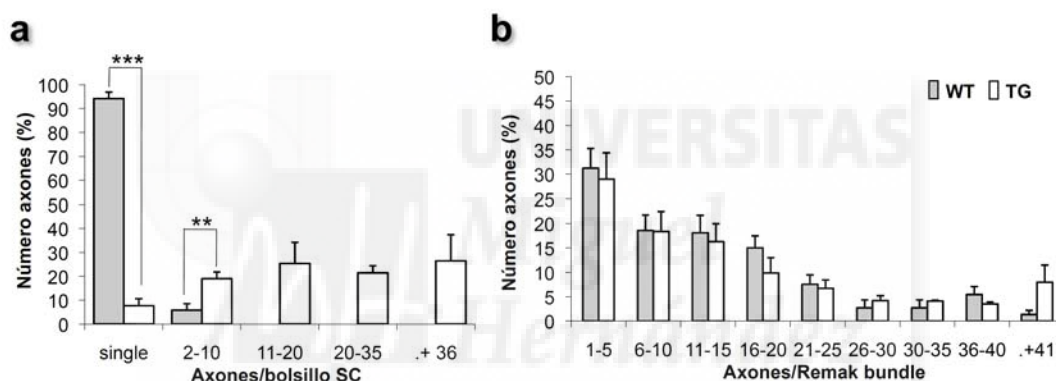


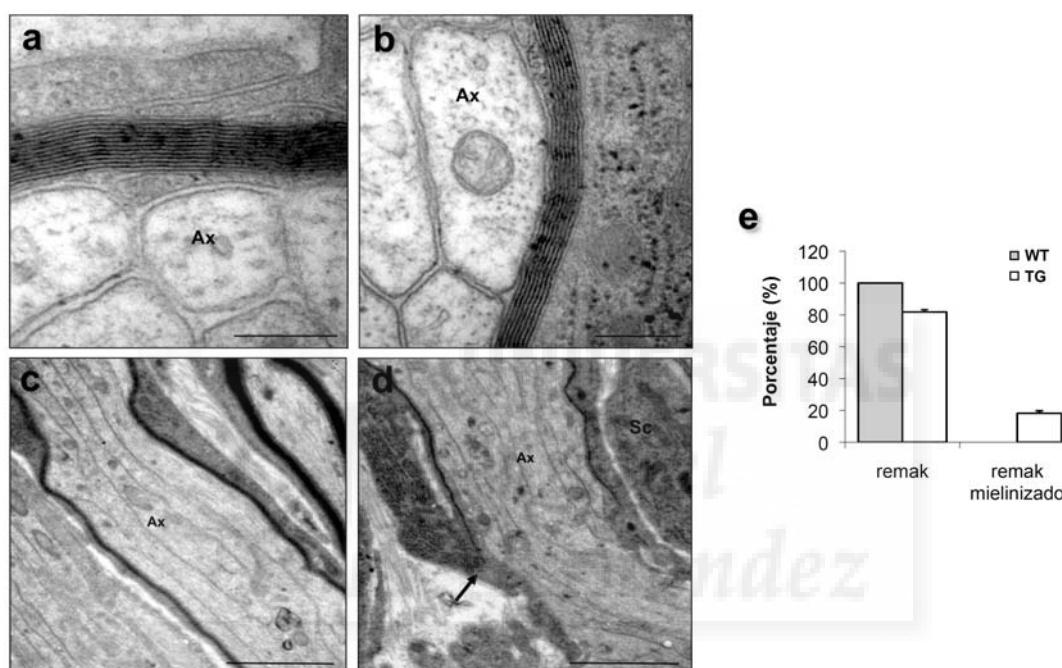
Figura R20: La distribución de los axones en los *Remak bundles* de los nervios transgénicos **a**. El número de axones por “bolsillo” de la célula de Schwann está notablemente incrementado en los ratones transgénicos, diferenciándose de los ratones silvestres, donde la mayoría de los axones están en un bolsillo individual **b**. Sin embargo, el número de axones por *Remak bundle* no se encuentra apenas alterado.

3.6.2. SMDF instruye la mielinización de los haces de *Remak*.

Como ya ha sido adelantado, en los ratones silvestres la mayor parte de los axones en los haces de Remak se encuentran rodeados por el citoplasma de la célula de Schwann no mielinizante. Sin embargo en los haces transgénicos da la impresión que la célula de Schwann haya sido “exprimida” de entre los axones quedando alrededor de ellos. Curiosamente en un significativo porcentaje de estos haces desestructurados (18,7%; 32 haces de 171 observados, $n=4$) aparece una membrana electrón-densa alrededor de

todo el paquete de axones (figura R19 e, f y g), que en imágenes de microscopía electrónica a grandes aumentos es indistinguible de una capa de mielina (figura R21a).

En imágenes de microscopía electrónica de secciones longitudinales de nervios ciáticos se puede observar que la capa de mielina que rodea estos haces de *Remak* atípicos no es continua a lo largo de todo el haz (figura R21c y d), sugiriendo que el fenómeno de mielinización de estos haces no es igual de eficaz a lo largo de todo el eje longitudinal del nervio.



Al igual que ocurre con otros rasgos fenotípicos, en la línea de *NSE-hSMDF#2*^(+/-) los haces de *Remak* también presentan una alteración en la segregación y empaquetamiento de los axones. Además, y aunque no hemos realizado un estudio exhaustivo, también pudimos observar haces de *Remak* mielinizados en este genotipo.

3.6.3. Estudios en el nervio vago.

En los ratones silvestres, el nervio vago está notablemente menos mielinizado que el ciático. En el vago la mayor parte de los axones son de pequeño calibre y forman estructuras muy semejantes a los haces de Remak. Para ver si los vagos experimentan las mismas alteraciones observadas en la segregación y el empaquetamiento de los axones de los *Remak bundles* de los ciáticos transgénicos, hicimos un estudio detallado de la estructura de este nervio en los animales *NSE-hSMDF#1*^(+/-). En la figura R22, donde se muestran imágenes de microscopía electrónica de ratones de 20 días de edad, se puede apreciar que en el nervio vago del transgénico los haces de axones de pequeño calibre (semejantes a los *Remak bundles*) están modificados de la misma manera que en el nervio ciático. La segregación está alterada, no hay citoplasma de la célula de Schwann entre los axones, y la mayoría están en un mismo bolsillo. Además en un elevado porcentaje de estos haces aparece una capa electrodensa, que a gran aumento se identifica como mielina.

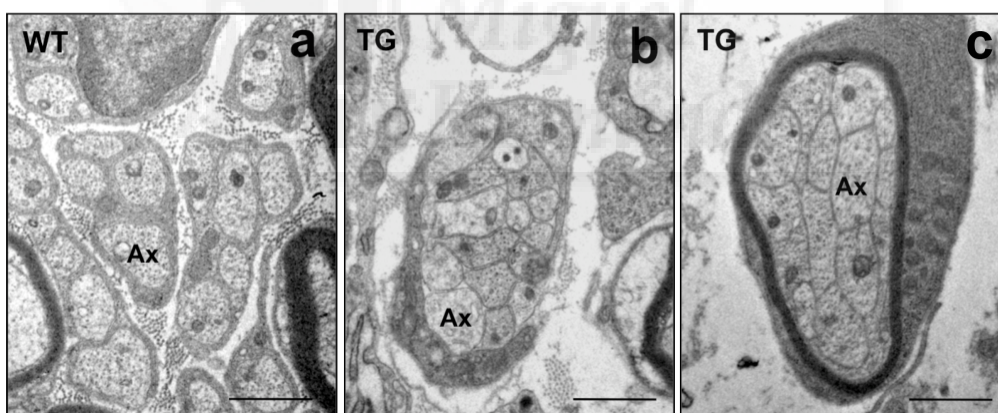


Figura R22: El nervio vago muestra la misma segregación de los axones y mielinización de los haces que el nervio ciático. **a.** Imagen de microscopía electrónica de un haz de axones silvestre. Se puede apreciar como el citoplasma de la nmSC rodea a los axones de pequeño calibre segregándolos en “bolsillos” diferentes. **b.** Haz en el ratón *NSE-hSMDF#1*^(+/-) donde se observa que los axones no están segregados, y el citoplasma de la nmSC está localizado solamente alrededor del haz de axones. **c.** Haz rodeando por una capa electrón-densa, que corresponde a una capa de mielina.

3.6.4. La desestructuración de los haces mutantes y su mielinización no afecta a la distribución de sus diámetros.

Para averiguar si la degeneración de los haces de Remak en los nervios transgénicos afecta a la estructura de los axones que los forman, medimos, en imágenes de microscopía electrónica, los diámetros de los axones de los *Remak bundles* en los ratones silvestres y los transgénicos, distinguiendo en estos últimos aquellos axones que están en un haz no mielinizado de los que están en uno mielinizado.

En la figura R23 se puede apreciar que la distribución de los axones por su diámetro es parecida en el *Remak bundle* del nervio ciático de los animales silvestres y los transgénicos. Tampoco existen grandes diferencias en la distribución de los axones que están en un haz no mielinizado o mielinizado. Lo mismo sucede en el nervio vago, donde no existen muchas diferencias en la distribución de los diámetros de los axones entre haces silvestres y transgénicos, ni dentro de estos últimos, entre un haz no mielinizado y uno mielinizado (figura R23).

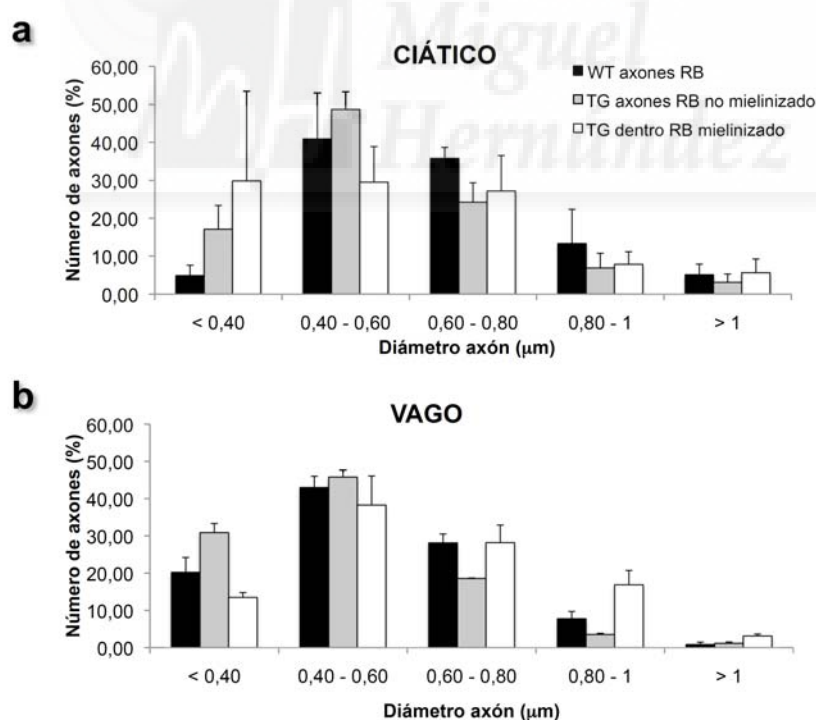


Figura R23: Morfometría de los axones situados en el interior de los haces de Remak. **a.** Distribución de tamaño de axones de Remak bundles de nervios ciáticos silvestres (negro) y transgénicos, diferenciando en la distribución los axones de los Remak no mielinizados (gris claro) y los mielinizados (blanco). **b.** Distribución de los axones en los haces del nervio vago.

3.6.5. Consecuencias de la mielinización de los haces de *Remak* sobre la velocidad de conducción nerviosa.

La mielinización incrementa dramáticamente la velocidad de conducción nerviosa en los vertebrados. Puesto que los haces de Remak de los animales transgénicos están mielinizados, decidimos averiguar si esto modifica de alguna manera la velocidad de conducción de los axones de pequeño calibre. Para comprobar el efecto que tiene la mielinización sobre la velocidad de conducción nerviosa, determinamos la velocidad de conducción *ex vivo* de las fibras C. Para ello registramos potenciales de acción compuestos de los nervios ciáticos. El estudio fue realizado en colaboración con el Dr. Mikel López de Armentia (miembro del laboratorio del Dr. Ángel Barco, localizado en el Instituto de Neurociencias de Alicante).

Las fibras C tienen una velocidad de conducción lenta ($<1\text{m/s}$) en los ratones silvestres, debido a que el impulso nervioso debe recorrer todo el axón y no es transmitido de manera saltatoria como sucede en los axones mielinizados o fibras A, que tienen una velocidad de conducción mucho mayor.

El registro extracelular se hizo disecando los dos ciáticos del ratón después de anestesiarlo y posterior perfusión cardiaca con solución salina oxigenada (95%O₂/5%CO₂), evitando el pinzamiento del nervio durante la disección. Con un electrodo de succión se realizaba el estímulo en un extremo del nervio y se registraba por el extremo opuesto. Los estímulos se hicieron a temperatura ambiente (4 ratones por genotipo) y a 31°C (2 ratones por genotipo).

Como se aprecia en la figura R24a, las fibras C tienen una velocidad de conducción menor en los ratones transgénicos que en los ratones silvestres, y esto sucede a las dos temperaturas utilizadas en el registro (figuras R24b). Curiosamente, en las fibras A también se produce una disminución de la velocidad de conducción (figuras R24c), lo cual puede ser debido a que el diámetro de las fibras mielinizadas es menor en los ratones mutantes que en los silvestres (figura R17). En apoyo de esta idea, la amplitud de despolarización (figura R24e) también se encuentra significativamente disminuida en el ratón transgénico ($p<0,05$), seguramente consecuencia de la disminución del diámetro en los axones mielinizados.

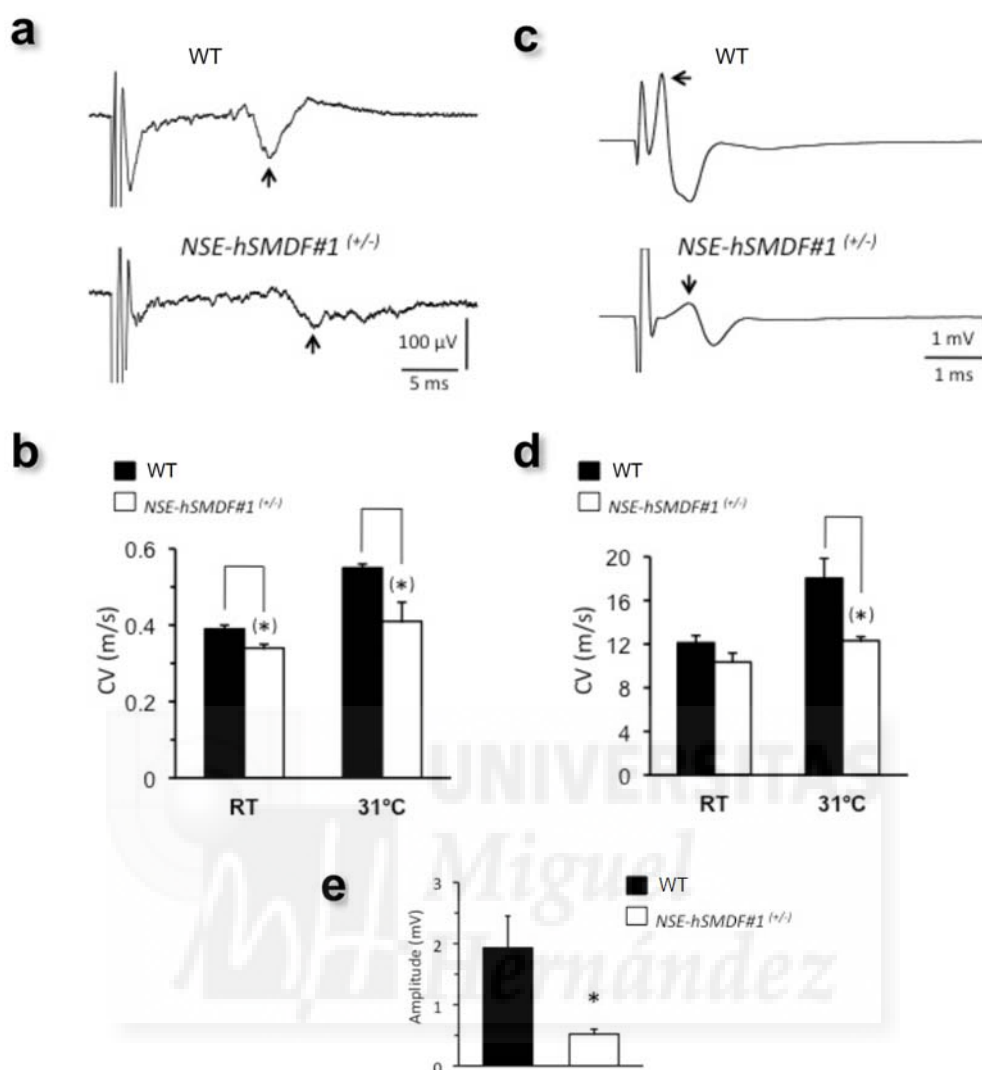


Figura R24: La velocidad de conducción de las fibras C y A está disminuida en los ratones transgénicos. **a.** Registro del potencial acción compuesto de los ratones silvestres y de los *NSE-hSMDF1*^(+/-). Las flechas indican la señal producida por las fibras C. **b.** Cuantificación, a temperatura ambiente (RT) y 31°C, de la velocidad de conducción (CV). Como se aprecia, está disminuida en los ratones mutantes. **c. y d.** La velocidad de conducción en las fibras A (fibras mielinizadas) también está reducida, probablemente como consecuencia de la reducción de los diámetros del axón en los ratones transgénicos. Las flechas indican la señal producida por las fibras A. **e.** La amplitud de despolarización está significativamente disminuida en las fibras mielinizadas (fibras A) de los ratones mutantes. (n=4 por genotipo y p<0,05, prueba t de muestras independientes).

4. Los ratones *NSE-hSMDF*^(+/-) desarrollan lesiones similares a los neurofibromas.

Los tumores del SNP se suelen manifestar en dos tipos histológicos fundamentales, los neurofibromas y los schwannomas. Los neurofibromas son tumores benignos sin encapsular, y están constituidos fundamentalmente por células de Schwann, fibroblastos y una gran cantidad de matriz extracelular con colágeno envolviendo los axones. También contienen muchos otros tipos celulares, que incluyen células del perineuro, mastocitos y células endoteliales (Peltonen, Jaakkola et al. 1988; Sanguinetti, Greco et al. 1991). En contraste, los schwannomas son tumores benignos encapsulados, compuestos casi exclusivamente de células de Schwann (Corfas, Velardez et al. 2004; McClatchey 2007).

Aunque no exclusivamente, los neurofibromas se presentan fundamentalmente en enfermos de neurofibromatosis tipo 1 (NF1). La NF1 es una de las enfermedades mendelianas más comunes en el ser humano, afectando aproximadamente 1 de cada 3500 recién nacidos (Gutmann 2001; Theos y Korf 2006; Le y Parada 2007). La neurofibromatosis produce un engrosamiento de los nervios, que a nivel microscópico se caracteriza por hiperplasia celular, disociación de las células de Schwann de los axones, incremento de colágeno en la matriz extracelular y acumulación de mastocitos (Zhu, Ghosh et al. 2002; Ling, Wu et al. 2005). Como ya se ha indicado con anterioridad, el ratón transgénico *NSE-hSMDF#1*^(+/-) presenta un dramático engrosamiento en los nervios periféricos. Como se puede observar en la figura R12, el ratón transgénico tiene los ganglios raquídeos dorsales y sus raíces mucho más gruesos que los de sus hermanos silvestres. Además, como ya se ha descrito con anterioridad, el número de células de Schwann en estos ratones está dramáticamente aumentado. Este aumento se debe fundamentalmente al incremento en el número de las células de Schwann no mielinizantes. Estas características reproducen, al menos parcialmente, los hallazgos histológicos encontrados habitualmente en los neurofibromas plexiformes. Para tratar de averiguar hasta qué punto estos tumores se asemejan a los neurofibromas, decidimos explorar en mayor detalle la histología de los tumores de los ratones *NSE-hSMDF#1*^(+/-).

4.1. Acumulación de colágeno extracelular.

Para saber si, al igual que en la neurofibromatosis, la matriz extracelular de los nervios transgénicos *NSE-hSMDF#1*^(+/-) está enriquecida en fibras de colágeno, utilizamos la Tinción de Gomori e imágenes de microscopía electrónica.

4.1.1. Tinción de Gomori

La tinción de Gomori (*Trichrome Stain LG Solution*) tiñe de verde las fibras de colágeno, y en púrpura el citoplasma celular. En una sección longitudinal del nervio ciático de un ratón silvestre (figura R25a) se puede apreciar que la mayor parte del endoneurio se tiñe de púrpura, lo que demuestra la escasez de colágeno en el espacio extracelular. En estos nervios sólo se tiñe de verde el perineuro, probablemente por el colágeno producido por los fibroblastos que lo forman.

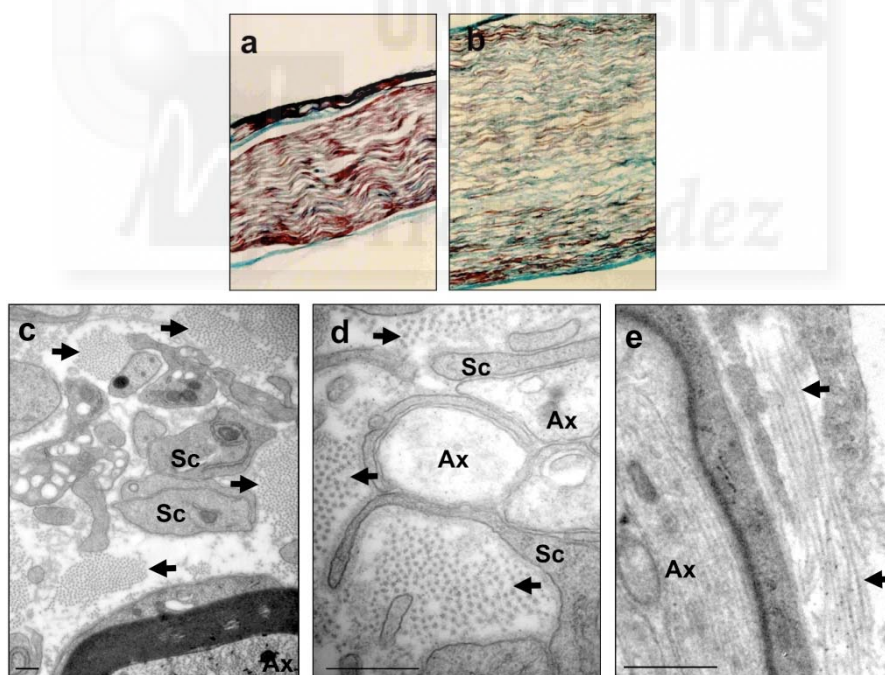


Figura R25: Acumulación de colágeno extracelular en los nervios ciáticos mutantes. **a.** Tinción de Gomori en un nervio ciático silvestre, donde se aprecia que el colágeno (verde) está localizado en el perineurio, y en interior del nervio la mayoría es citoplasma (púrpura) **b.** Por el contrario, el nervio mutante presenta mucho acumulo de colágeno (verde) en la matriz extracelular del endoneurio. **c y d.** Imagen de microscopía electrónica a gran aumento de una sección transversal del nervio, donde se aprecian los depósitos de colágeno en la matriz extracelular. **e.** Las fibras de colágeno en un corte longitudinal del nervio ciático visto en imagen de microscopía electrónica.

Por el contrario, en los cortes longitudinales del nervio ciático del ratón transgénico (ver figura R25) se aprecia una gran cantidad de material teñido de verde, lo que sugiere una acumulación de colágeno extracelular en el endoneurio (figura R25b).

4.1.2. Estudios de microscopía electrónica.

Para comprobar si es realmente colágeno lo que se acumula en el espacio extracelular del endoneurio del nervio mutante, obtuvimos imágenes de microscopía electrónica de alta resolución. Como se aprecia en las figuras R25c, d y e, el espacio extracelular del endoneurio en los ratones transgénicos muestra un notable acúmulo de fibrillas de colágeno.

4.2. Desarrollo de tumores en el sistema nervioso periférico.

Aproximadamente un 5% de los enfermos aquejados de neurofibromatosis tipo I desarrollan tumores malignos del sistema nervioso periférico (MPNST del inglés *malignant peripheral nerve sheath tumours*). Estos tumores son muy agresivos y ensombrecen enormemente el pronóstico de estos enfermos. Durante el desarrollo de nuestros experimentos observamos que algunos de los ratones *NSE-hSMDF#1*^(+/-) desarrollan, a partir de los ocho meses de edad, determinados síntomas neurológicos motores (espasticidad, paraplejía, etc...). En cuanto detectamos estos problemas los ratones son sacrificados y necropsiados con el objeto de determinar la etiología de estos síntomas. Encontramos que todos estos ratones presentan tumores localizados en diferentes regiones del sistema nervioso periférico (nervio braquial, raíces nerviosas cervicales, ganglios raquídeos y ganglio trigémino) que podían explicar los síntomas neurológicos. Hemos observado que la mayor parte de estos tumores aparecen entre los ocho meses y los dos años de edad. En concreto 12 de 89 ratones (13,5%) de la línea *NSE-hSMDF#1*^(+/-), y 4 de 38 ratones (10,5%) de la línea *NSE-hSMDF#2*^(+/-) presentaron tumores de suficiente entidad para ser detectados mediante la observación clínica. Es de destacar que ninguno de los ratones silvestres hermanos de camada ha desarrollado ningún tumor en el sistema nervioso periférico durante el periodo de seguimiento (0 de 29 ratones hermanos de camada de la línea *NSE-*

hSMDF#1^(+/-)). Puesto que estos tumores se producen en ambas líneas, son probablemente consecuencia de la sobre-expresión del transgén y no causados por efectos posicionales de éste.

4.2.1. Aspecto macroscópico e histológico del tumor.

En criocortes de estos tumores realizamos una inmunofluorescencia para las proteínas GFAP y S100, ambos marcadores de células de Schwann. En la figura R26 se puede apreciar que los tumores son positivos para los dos marcadores, sugiriendo que las células que están proliferando tienen su origen en las células de Schwann, en concreto en las células de Schwann no mielinizantes. La mayoría de los tumores se producen en los ganglios raquídeos de la región cervical y las raíces nerviosas dorsal y ventral, aunque también se han desarrollado tumores en el ganglio trigémino o en el nervio braquial (figura R26).

4.2.2. El patrón de expresión génica sugiere que los tumores se originan a partir del linaje de las células de Schwann.

Para caracterizar en mayor detalle el patrón de expresión génica de los tumores se obtuvo RNA total, se realizó una retrotranscripción y con el cDNA obtenido se realizaron PCRs con oligonucleótidos específicos. En la figura R27 se puede observar que en los tumores se detecta mRNA para MBP, PLP, CNPasa y PDGFR α . La presencia de estos mRNA de nuevo apoya la idea de que estos tumores se originan a partir de las células de Schwann.

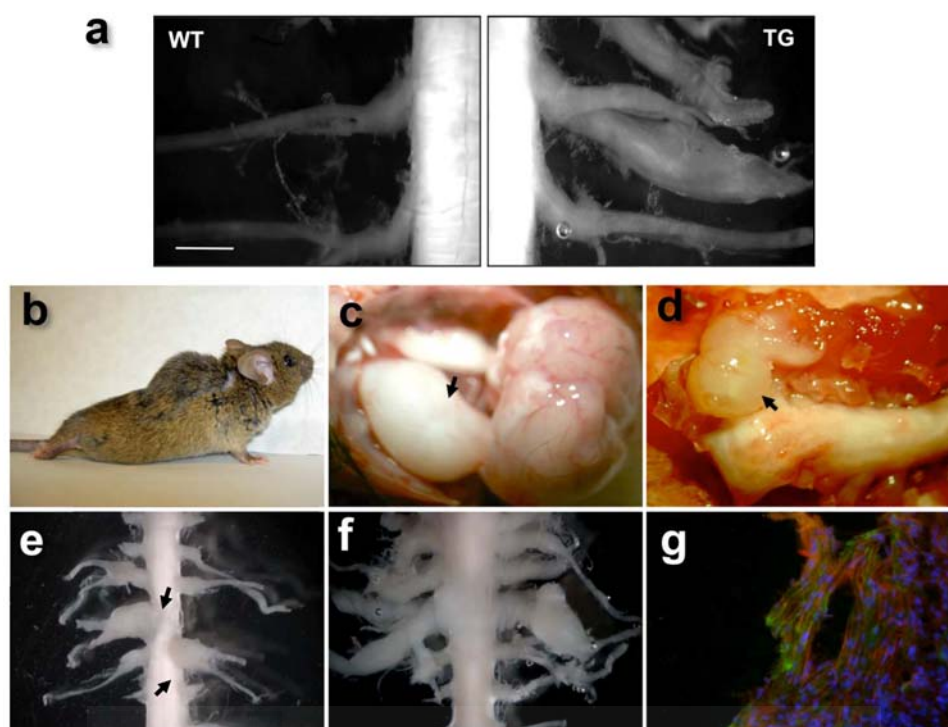


Figura R26: La señalización axón-glia continuada por neuregulina induce tumorigénesis. **a.** Aparición de un tumor en las raíces nerviosas de un ratón transgénico (TG) *NSE-hSMDF#1*^(+/+). Se compara a un hermano de camada silvestre (WT). **b.** Los tumores producen síntomas neurológicos, como son la parálisis de las patas y alteraciones posturales. **c.** Tumor en el ganglio trigémino de un ratón mutante. **d.** Tumor originado en un ganglio raquídeo cervical. **e.** Los tumores que se originan en los ganglios raquídeos y sus raíces nerviosas habitualmente comprimen la médula espinal. **f.** Engrosamiento de múltiples nervios y ganglios raquídeos de la zona cervical y dorsal de la columna vertebral.

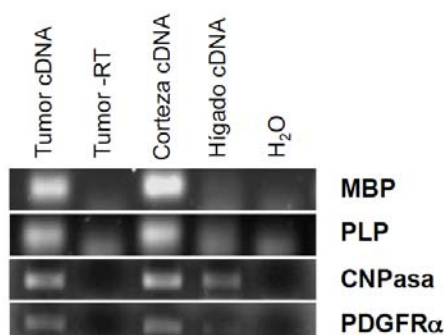


Figura R27: Expresión de mRNA para marcadores (P0, MBP, PLP y CNPasa) de células de Schwann en los tumores desarrollados por la sobre-expresión de hSMDF en los ratones mutantes. El tamaño de todos los productos es de alrededor de 100pb.

4.3. ¿Contribuye la sobreactivación de la vía NRG1-erbB al desarrollo de tumores del SNP en la neurofibromatosis tipo 1?

Algunos resultados preliminares.

El gen *Nf1* codifica para una “proteína estimuladora de la actividad GTPasa” cuya función es aumentar la capacidad de hidrólisis de proteínas como RAS, reduciendo la cantidad de GTP unido, y por lo tanto disminuyendo la activación de las vías dependientes de RAS. La eliminación del gen *Nf1* tiene como consecuencia un aumento de la proliferación celular en los nervios periféricos, proliferación que se acaba traduciendo en el desarrollo de neurofibromas. Interessantemente, la eliminación de una sola copia de *Nf1* en ratones (los homocigotos no son viables) no tiene efecto alguno en la estructura de los nervios del SNP, ni favorece el desarrollo de neurofibromas u otro tipo de tumores en los nervios. Para esto es necesario bien eliminar la segunda copia (pérdida de heterocigosidad) de *Nf1* mediante la generación de mutantes condicionales utilizando la recombinasa *Cre* u obteniendo dobles heterocigotos de *Nf1* y *p53* (un gen supresor de tumores) (Cichowski, Shih et al. 1999; Vogel, Klesse et al. 1999). Ambos genes, *Nf1* y *p53*, están presentes en el mismo cromosoma en los humanos y en los ratones (Copeland, Jenkins et al. 1993). Curiosamente mediante el uso de herramientas bioinformáticas, hemos observado que el gen que codifica uno de los receptores de las neuregulinas (*erbB2*) se encuentra en el mismo cromosoma, muy próximo a *Nf1*. Puesto que la activación de la vía de las neuregulinas es la causante de ciertos tipos de tumores (como algunos tipos de cáncer de mama) (Alroy y Yarden 2000), decidimos explorar si existe sinergia entre las mutaciones de *Nf1* y la sobre-activación de la vía Nrg1-erbB a la hora del desarrollo de tumores en el SNP.

Para ello importamos ratones *Nf1*^(+/-) y los cruzamos con los ratones *NSE-hSMDF#1*^(+/-), para producir dobles mutantes heterocigotos *Nf1*^{(+/-);NSE-hSMDF#1}^(+/-); a continuación caracterizamos la progenie en cuanto a la aparición de neurofibromas y otros tumores.

Los ratones *Nf1*^(+/-), obtenidos del *Jackson Laboratory* (B6.129S6-Nf-1tm1Fcr/J, Stock Number: 002646), no presentan, en heterocigosis, un fenotipo evidente en el SNP. De hecho estos ratones no desarrollan neurofibromas,

aunque sí están predispuestos a padecer otros tipos de tumores con la edad, como son feocromocitomas y leucemias mieloides, entre los 18 y 28 meses de vida (Jacks, Shih et al. 1994). Como hemos indicado previamente, los ratones dobles mutantes $Nf1^{(+/-)};p53^{(+/-)}$ presentan una cooperación en el desarrollo de tumores del SNP (Cichowski, Shih et al. 1999; Vogel, Klesse et al. 1999), por lo que realizamos este cruce como control positivo. Un segundo control utilizado fue cruzar $NSE-hSMDF\#1^{(+/-)}$ y $p53^{(+/-)}$, lo cual nos permitiría estudiar a su vez la posible cooperación entre la sobre-activación de la vía de las neuregulinas y las mutaciones en p53 en el desarrollo de tumores en el SNP.

Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, y se observaron diariamente para buscar evidencias de enfermedad. Los animales eran sacrificados cuando presentaban algún síntoma en la alteración de su comportamiento, movilidad o aparición de algún tumor palpable.

En la figura R28 están representadas las diferentes curvas de supervivencia (o curvas de Kaplan-Meier) para cada cruce de los dobles mutantes, es decir, el cruce $Nf1^{(+/-)} \times NSE-hSMDF\#1^{(+/-)}$ y los cruces controles: $Nf1^{(+/-)} \times p53^{(+/-)}$ y $NSE-hSMDF\#1^{(+/-)} \times p53^{(+/-)}$, los datos han sido analizados usando el programa estadístico GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Estos experimentos están todavía en pleno desarrollo. Sin embargo ya podemos adelantar algunos resultados preliminares. Como se puede observar en la gráficas los dobles mutantes para $Nf1$ y $NSE-hSMDF$ no han presentado, hasta el momento, un aumento en la frecuencia de aparición de tumores. Si bien tampoco hemos observado de momento tumores del SNP en los dobles mutantes $Nf1^{(+/-)};p53^{(+/-)}$ lo cual contrasta con estudios previos donde empezaban a observar un aumento en la aparición de tumores a partir de las 30 semanas para los cruces con ausencia de una copia de $Nf1$ y de $p53$ en cromosomas diferentes (mutantes heterocigotos en trans) (Cichowski, Shih et al. 1999; Vogel, Klesse et al. 1999). En cualquier caso hay que recordar que nuestros datos son muy preliminares, ya que nuestra colonia de dobles heterocigotos contiene de momento un número bajo de ratones con edades superiores a 25 semanas.

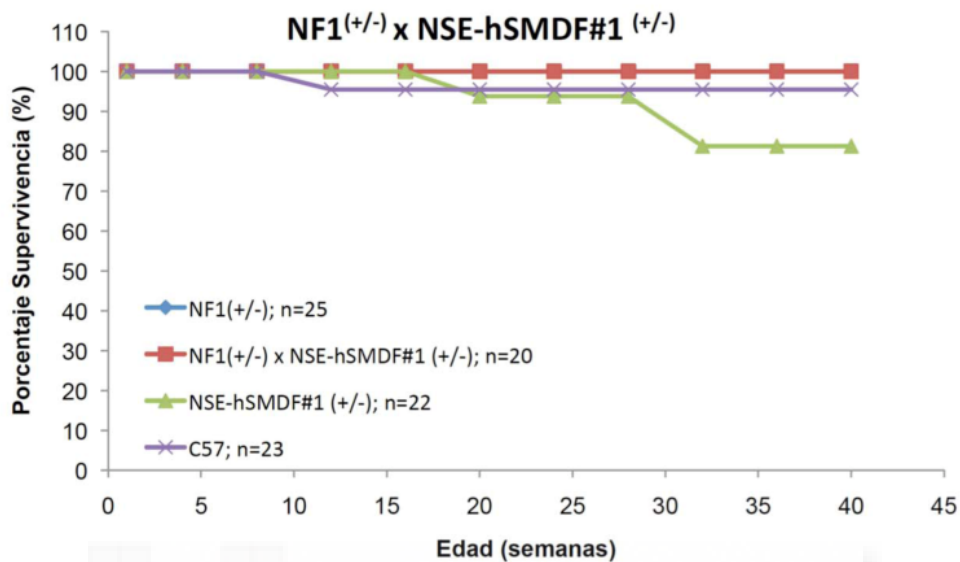
Donde sí encontramos ya un efecto drástico en la frecuencia de aparición de tumores es en el cruce $NSE-hSMDF\#1^{(+/-)} \times p53^{(+/-)}$ (figura R28c).

La falta de una copia del gen *p53* junto a la sobre-activación de la vía NRG1-erbB (por la sobre-expresión del ligando SMDF en neuronas) provoca que todos (100%) los dobles mutantes desarrollen tumores en el sistema nervioso periférico antes de los 6 meses de edad ($5,4 \pm 1,3$ meses). Más del 80% de los casos detectados presentaban ataxia o parálisis de alguna pata y todos estos casos eran provocados por tumores en nervios y ganglios raquídeos cervicales que presionaban la médula espinal.

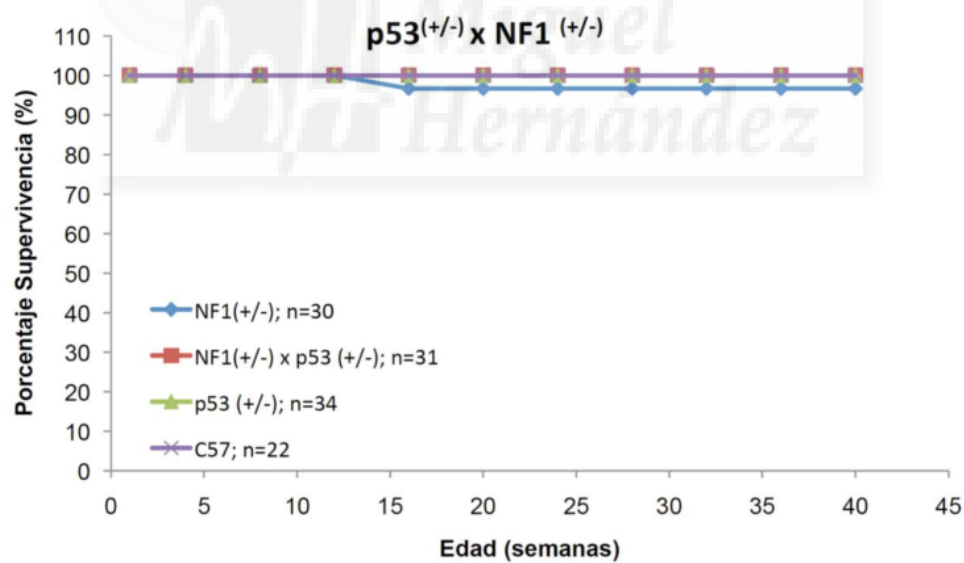
Tomados en conjunto nuestros datos sugieren que las mutaciones inactivantes de *p53* podrían colaborar con la sobre-activación de la señalización axón-glia mediada por las neuregulinas en el desarrollo de algunos tipos de tumores en el SNP. Sin embargo y aunque interesante desde el punto de vista mecanístico, la relevancia de este proceso en patología humana está todavía sin determinar.



a



b



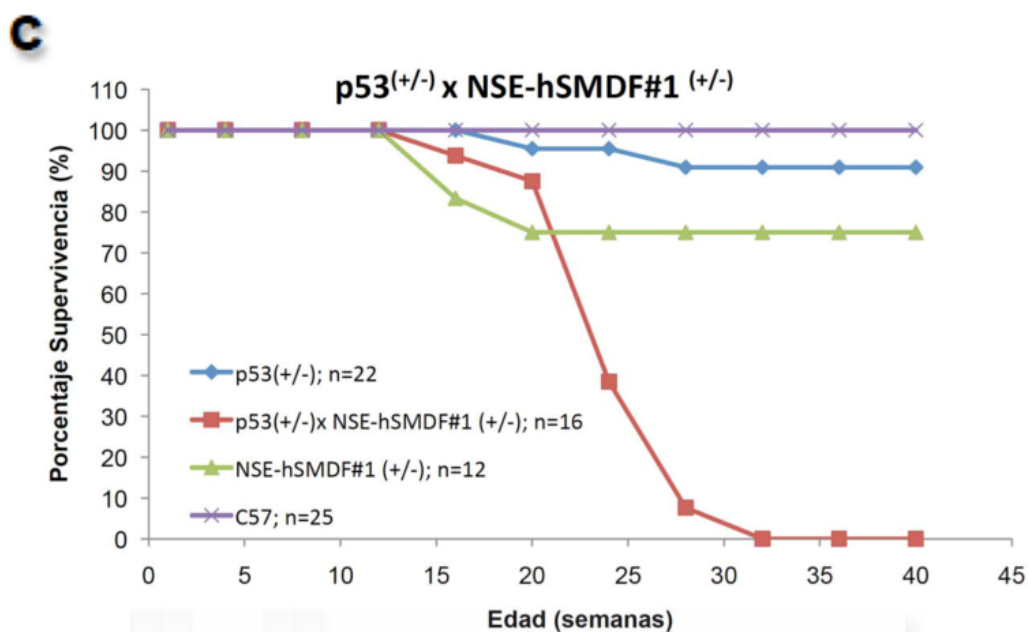


Figura R28: Curvas de supervivencia de los diferentes cruces realizados entre los genotipos *NSE-hSMDF#1^(+/-)*, *Nf1^(+/-)* y *p53^(+/-)*. En cada curva se representan los cuatro genotipos posibles por cruce, es decir, los animales silvestres para las dos mutaciones, los animales mutantes para los dos genes y los animales mutantes para cada gen. a. Curvas del cruce *Nf1^(+/-) x NSE-hSMDF#1^(+/-)*. b. Curva del cruce *Nf1^(+/-) x p53^(+/-)*; no se observa de momento un efecto de la doble heterocigosidad en *Nf1* y *p53*. c. Curva del cruce *NSE-hSMDF#1^(+/-) x p53^(+/-)*; los dobles mutantes tienen una mortalidad del 100% al desarrollarse en todos ellos tumores del sistema nervioso periférico antes de los 6 meses.



Discusión

Las neuregulinas son proteínas de señalización intercelular fundamentales para el desarrollo del sistema nervioso y la biología de las neuronas y las células gliales diferenciadas (Meyer, Yamaai et al. 1997; Jessen y Mirsky 2002; Jessen y Mirsky 2005). Sólo las neuregulinas de tipo III, que se caracterizan por presentar una región rica en cisteínas (CRD), parecen estar implicadas en la mielinización del sistema nervioso periférico (Michailov, Sereda et al. 2004; Taveggia, Zanazzi et al. 2005). El procesamiento alternativo del RNA (*splicing*) produce dos isoformas distintas de neuregulinas tipo III, la tipo III- β 1a y la tipo III- β 3. La primera neuregulina tipo III descrita fue la neuregulina 1 tipo III- β 3, también conocida como SMDF. Esta proteína es abundantemente expresada en motoneuronas y neuronas sensoriales de los ganglios raquídeos (Ho, Armanini et al. 1995), donde se localiza en las balsas lipídicas de la membrana (*lipid rafts*) (Cabedo, Luna et al. 2002; Cabedo, Carteron et al. 2004; Decker y French-Constant 2004). La isoforma tipo III- β 3 se diferencia de la isoforma III- β 1a (figura I5) por carecer de una secuencia transmembrana y una cola citoplasmática después del dominio *EGF-like* (ver introducción) (Falls 2003).

Michailov y colaboradores propusieron en el 2004 que la neuregulina tipo III- β 1a es la señal que las neuronas utilizan para que las células de Schwann mielinicen sus axones, regulando además el grosor de la capa de mielina (Michailov, Sereda et al. 2004). Taveggia y colaboradores, en el 2005, observaron que la expresión artificial de la isoforma III- β 1a inducía la mielinización de las neuronas del ganglio cervical superior en cultivo, que habitualmente son amielínicas (Taveggia, Zanazzi et al. 2005). Todos estos datos sugieren que son los niveles de esta neuregulina, y no el tamaño del axón, lo que determina si éste va a ser mielinizado o no (Nave y Salzer 2006).

Nuestros resultados demuestran que, en contraste con lo que ocurre con la isoforma III- β 1a, la sobre-expresión neuronal de la isoforma III- β 3 *in vivo* no produce un incremento en el grosor de la capa de mielina en los axones del nervio ciático. De hecho, observamos una dramática disminución en la cantidad de proteínas marcadoras de la mielina como son MBP, CNPasa y P0 (Figuras R9 y R10). Esta caída no se traduce en una disminución del grosor de la capa

de mielina como cabría esperar, ya que la media de los *g-ratio* es la misma para los ratones transgénicos y los silvestres (figura R10). Además, la distribución del tamaño de los axones mielinizados respecto al *g-ratio* no muestra una diferencia clara entre los dos genotipos. Únicamente los axones de mayor tamaño parecen estar ligeramente hipomielinizados en los animales transgénicos (mayor *g-ratio*), apoyando la idea de que la sobre-expresión de SMDF no produce un aumento en el grosor de la capa de mielina.

Interesentemente, hemos observado que la sobre-activación de la vía de las neuregulinas por SMDF aumenta la expresión de determinados factores de transcripción que controlan el desarrollo de las células Schwann y el proceso de mielinización, como son Sox10 y Oct-6 (ver figura R11), sugiriendo un efecto promielinizante. Sin embargo, otro de los factores “maestros” en la mielinización, Krox20 (un efector de Sox10 y Oct-6) no muestra cambios de expresión (figura R11), lo que puede explicar la incapacidad de la neuregulina tipo III- β 3 para aumentar el grosor de la capa de mielina en los animales mutantes.

A pesar de haber utilizado un promotor distinto al utilizado por otros autores (*Thy1* en trabajos previos y *NSE* en nuestro trabajo) no creemos que éste sea el motivo de la discrepancia fenotípica observada, ya que ambos promotores han sido utilizados en más de una ocasión para la sobre-expresión de proteínas en neuronas (Morris, Barber et al. 1983; Kollias, Spanopoulou et al. 1987; Forss-Petter, Danielson et al. 1990; Vega, Rodriguez et al. 1990). Además, estos estudios sugieren que ambos promotores tienen un perfil de expresión semejante (Kollias, Spanopoulou et al. 1987; Forss-Petter, Danielson et al. 1990). Para confirmarlo decidimos determinar el perfil de expresión de estos promotores durante el desarrollo postnatal a partir del RNA extraído de los ganglios raquídeos de ratones silvestres a los 0, 10 y 20 días de edad. En la figura D1 se aprecia la expresión de ambos promotores aumenta con el desarrollo postnatal, aunque el promotor *Thy1* lo hace de una manera más dramática que el promotor *NSE*.

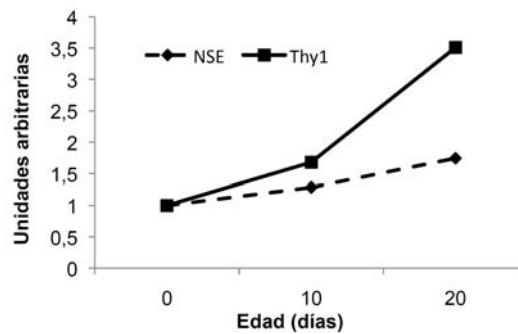


Figura D1: Perfil de expresión de los promotores *NSE* y *Thy1* en el ganglio raquídeo a 0, 10 y 20 días de edad (resultados normalizados). Se utilizó el RNA 18S como referencia en ambos casos.

Nuestros resultados confirman los obtenidos por Forss-Petter y colaboradores, quienes mostraron que la expresión dirigida por *NSE* se incrementa durante el desarrollo postnatal del ratón, alcanzando un máximo a las tres semanas de vida (Forss-Petter, Danielson et al. 1990). Además, esta ventana de expresión se corresponde con el proceso de mielinización en los nervios del SNP (Garbay, Heape et al. 2000), lo que valida su uso para este tipo de estudios.

El promotor *NSE* ha sido frecuentemente utilizado para dirigir la expresión de proteínas en neuronas, y hasta la fecha (y en concordancia con nuestros resultados) no se ha reportado su expresión en las células de Schwann u otros tipos de glia. Apoyando esta idea, un estudio reciente muestra que la proteína PrP bajo el promotor *NSE* es expresada en las neuronas del nervio ciático pero no en las células de Schwann de los nervios mutantes (Bremer, Baumann et al. 2010). Por todo ello, nos consideramos en condiciones de atribuir los efectos fenotípicos observados en el ratón *NSE-SMDF* a la acción yuxtracrina del SMDF axonal sobre las células de Schwann, y no a una expresión aberrante del transgén en las células de Schwann.

Nuestros resultados sugieren que la isoforma III- β 3 y la isoforma III- β 1 de NRG1 tienen un papel diferente en el proceso de mielinización: la III- β 3 controlando el número de células de Schwann y la tipo III- β 1 el proceso de mielinización y el grosor de la mielina.

El motivo del diferente efecto entre ambas neuregulinas es desconocido para nosotros, ya que ambas proteínas comparten el dominio N-terminal (CRD) y el *EGF-like*, el cual queda expuesto en la superficie del axón y es suficiente para activar los receptores erbB. Sin embargo, resulta interesante que el dominio C-terminal de la isoforma III- β 1a (ausente en SMDF) sirva como mecanismo de señalización retrógrado en las neuronas que lo expresan (Bao, Wolpowitz et al. 2003). Es concebible que el efecto pro-mielinizante de esta isoforma necesite de la expresión de algún otro factor dependiente de este mecanismo retrógrado. La ausencia de este mecanismo retrogrado en SMDF podría así obstaculizar su efecto promielinizante. De todas maneras no existe una evidencia experimental que apoye esta hipótesis.

Respecto a la capacidad mitogénica de SMDF, resulta interesante destacar que en un estudio reciente de Danovi y colaboradores, mediante una criba genética en busca de factores oncogénicos para las células de Schwann, han aislado el cDNA que codifica para SMDF. En este trabajo los autores demuestran que SMDF provoca una transformación oncogénica pero no las neuregulinas de tipo I), al ser expresadas de forma ectópica en la células de Schwann. La transformación oncogénica está caracterizada por una proliferación independiente de anclaje, una pérdida de la inhibición por contacto y tumorigenicidad (Danovi, Cremona et al. 2010). Este comportamiento es consecuencia de la activación constitutiva de la vías de señalización NRG1-erbB y PI3K, de una manera semejante a lo que ocurre con los ratones *NSE-hSMDF^(+/-)*.

Los efectos mitogénicos en las células de Schwann observados por la sobre-expresión de SMDF son también similares a los efectos observados por de Huijbregts y colaboradores. En este estudio los autores generan un ratón transgénico que sobre-expresa la neuregulina tipo II- β 3 (GGF β 3) en las células de Schwann mielinizantes (ratón *P0-GGF β 3*) (Huijbregts, Roth et al. 2003). Aunque hay diferencias importantes entre este ratón y el ratón *NSE-hSMDF* (como son la isoforma de NRG1 sobre-expresada y el patrón de expresión topológico y temporal) es a nuestro parecer muy relevante que en ambos se produzca una hiperplasia de las células de Schwann. En este sentido, resulta interesante destacar que las proteínas GGF β 3 y SMDF comparten sus

extremos C-terminal y se diferencian únicamente en el N-terminal, generalmente destinado a dictar la solubilidad o anclaje a membrana de la isoforma (ver figura D2). Resulta por ello tentador especular que estas isoformas son la versión soluble y la versión de membrana de un factor mitogénico para las células de Schwann sintetizado por la neuronas con papeles diferentes en el desarrollo del sistema nervioso.

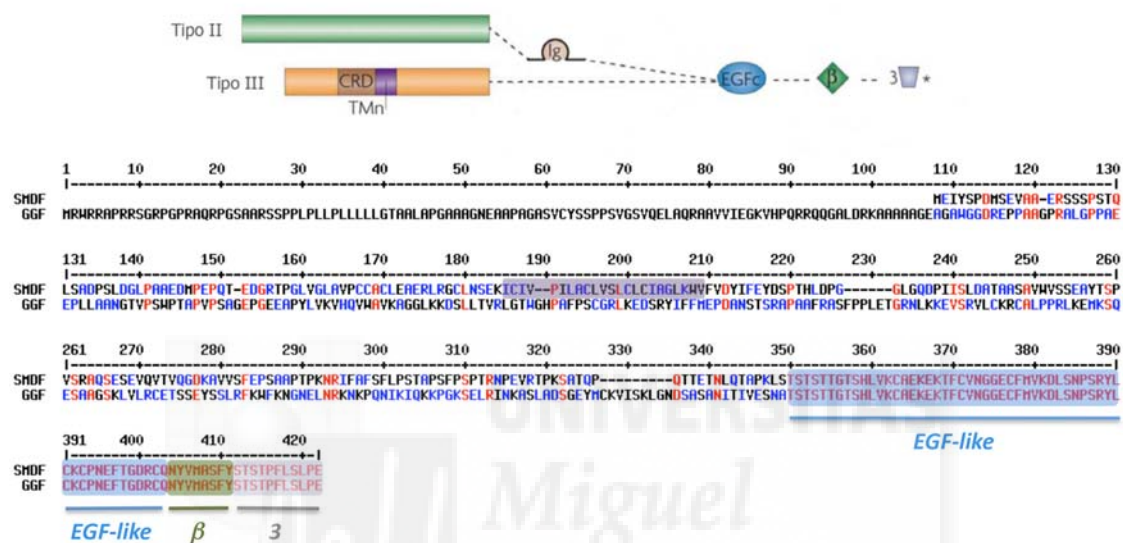


Figura D2: Alineamiento de las isoformas de neuregulina tipo II-β3 y la tipo III-β3.

Se puede apreciar que tienen una secuencia idéntica desde el *EGF-like* al dominio β3.

El papel de las neuregulinas en la mielinización del SNC parece mucho menos relevante. Mediante el empleo de diferentes ratones *knock-out* condicionales para la neuregulina 1, Brinckmann y colaboradores (2008), comprobaron que la ausencia de expresión de este gen en neuronas no produce efecto alguno en la capacidad de formación de mielina por los oligodendrocitos. Para descartar que el producto de algún otro gen de la familia de las neuregulinas (NRG2, 3 ó 4) pudiera compensar la eliminación de NRG1, estos autores generaron ratón un *knock-out* condicional para los receptores de neuregulinas (erbB3 y erbB4) en oligodendrocitos y sus precursores. Estos ratones mostraron también un proceso de mielinización normal, sugiriendo que la vía de las neuregulinas es dispensable para la mielinización del SNC. A pesar de ello, su papel no es del todo irrelevante ya que la sobre-expresión *in vivo* de neuregulinas (tanto tipo I como tipo III) produce una hipermielinización

de algunos axones en SNC (Brinkmann, Agarwal et al. 2008). Sorprendentemente, nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de la neuregulina tipo III- β 3 no provoca una hipermielinización detectable de los axones en el nervio óptico, ya que el *g-ratio* en ambos genotipos es similar (figura R7). Nuestros datos contrastan con los obtenidos por Brinkmann y colaboradores, quienes encontraban aumentos en el grosor de la capa de mielina con dos isoformas distintas. No obstante es destacable que no hemos realizado un estudio exhaustivo de la mielinización en diferentes edades y regiones del SNC, pudiéndose dar el caso que SMDF indujera la hipermielinización en regiones o/y edades no estudiadas. Sin embargo, también es posible que, al igual que ocurre en el SNP, la isoforma III- β 3 no tenga efecto alguno en la mielinización del SNC.

Nuestros resultados demuestran que la aparente caída en los niveles de expresión de las proteínas de la mielina en el ratón transgénico no es consecuencia de la desmielinización si no más bien se debe al incremento en el número de células de Schwann no mielinizantes, causado por un aumento en la proliferación de este tipo de células en estadios postnatales. Esto provoca un engrosamiento notable de las raíces nerviosas, ganglios y nervios periféricos (figura R12). Esta proliferación aumentada es probablemente consecuencia de la hiperactivación de la vía de RAS/MAPK (figura R8), desplazando la decisión entre la diferenciación y la proliferación de las células de Schwann hacia esta última (Ogata, Iijima et al. 2004).

Aunque está bien establecido que las neuregulinas estimulan la proliferación de las células de Schwann en cultivo (Stewart, Eccleston et al. 1991; Dong, Brennan et al. 1995; Levi, Bunge et al. 1995; Maurel y Salzer 2000), hasta la fecha no existían datos concluyentes *in vivo* (Jessen y Mirsky 2005). Nuestros resultados demuestran por primera vez que las neuregulinas actúan *in vivo* como mitógenos para las células de Schwann en los nervios ciático y vago. El exceso de la actividad mitogénica de esta neuregulina provoca un notable engrosamiento de los ganglios y los nervios de los ratones transgénicos, llegando a ser el área de la sección del nervio de los animales transgénicos varias veces superior al de los animales silvestres (figuras R12a y

R16c). Este engrosamiento se produce fundamentalmente durante el desarrollo postnatal tardío del ratón, ya que a los cinco días de edad los ratones silvestres y los mutantes tienen todavía el mismo área por sección transversal de nervio (figura R13). Sin embargo, a los 20 días ya existe una gran diferencia en el área por sección transversal entre ambos genotipos (tanto en el nervio ciático como en el nervio vago), presentando además los mutantes un número de núcleos por sección de hasta tres veces superior al de sus hermanos de camada (figuras R13c y R16e).

Al engrosamiento de los nervios transgénicos no contribuye el aumento en el número de axones, ya que no hemos observado una diferencia en su densidad de axones entre los dos genotipos. Tampoco el aumento de su volumen ya que la distribución de los perímetros axonales de los animales mutantes está desplazado hacia perímetros más pequeños (figura R15).

A los 5 días de edad la proliferación celular observada tanto en experimentos de pulso y caza con BrdU como tras el conteo de mitosis mediante inmunofluorescencia de pH3 es mayor en el ratón mutante. Sin embargo, esta diferencia se cancela a los catorce días (figuras R17 y R18). Esta cancelación se produce a pesar de estar las vías de RAS y PI3K hiperactivadas al menos hasta los 20 días de edad (figura R8). El motivo de este cese nos es desconocido. Es posible que otras vías de señalización que contrarresten la vía de RAS y PI3K se activen a partir de los 20 días de edad y bloqueen la proliferación, activando el programa de senescencia celular, ó incrementando la apoptosis. Este punto está siendo actualmente explorado en nuestro laboratorio.

Curiosamente la proliferación no se produce aparentemente a partir de células de Schwann mielinizantes desdiferenciadas, ya que los axones presentan una mielinización inalterada. Además, como se aprecia en la figura R14d, no hay una diferencia en el número de células mielinizantes (Krox-20 positivas) por unidad de longitud del nervio entre los animales silvestres y transgénicos. Por el contrario, la densidad de núcleos mielinizantes (núcleos Krox20 positivos/núcleos totales) está claramente disminuida en los ratones mutantes, apoyando la tesis de un incremento en el número de células no

mielinizantes en estos nervios ($32 \pm 6\%$ en el silvestre frente al $11 \pm 1\%$ núcleos krox20+ en los mutantes).

No todos los axones en los nervios periféricos están mielinizados. En general los axones con un diámetro menor de $1\mu\text{m}$ permanecen amielínicos formando parte de los haces de *Remak*. Por ello, durante mucho tiempo se ha pensado que solo los axones con un diámetro superior a $1\mu\text{m}$ eran capaces de inducir el fenotipo mielinizante de la célula de Schwann (Friede y Bischhausen 1982). Sin embargo estudios realizados en la última década sugieren que es la cantidad de neuregulina expresada en el axón la que dicta la transición de célula de Schwann no mielinizante a célula de Schwann mielinizante, independientemente del diámetro axonal (Nave y Schwab 2005). Si el nivel de NRG1 tipo III expresado en la superficie del axón esta por debajo del umbral, los axones asociados no son mielinizados, permaneciendo rodeados por el citoplasma de una célula de Schwann no mielinizante y formando parte de los haces de *Remak*.

La sobre-expresión de la isoforma III- β 3 de neuregulina 1 en los ratones *NSE-hSMDF^(+/-)* tiene dramáticos efectos en la estructura de los haces de *Remak* del nervio ciático, sugiriendo un papel relevante de esta vía de señalización en la génesis de estas estructuras. Así, y aunque la distribución del número de axones por *Remak bundle* no está alterada, los axones están mal segregados y mal empaquetados, localizándose en la mayoría de los casos todos los axones en un mismo bolsillo del *haz*, en claro contraste con los animales silvestres, donde más del 90% de los axones están en un bolsillo único e independiente (figura R20). Además, y posiblemente como consecuencia de la sobre-expresión de neuregulina III- β 3 en los axones finos, aproximadamente el 20% de los haces de *Remak* se produce una capa de mielina alrededor del bolsillo que contiene todos los axones empaquetados (figura R21). Esto sugiere que la sobre-expresión de SMDF activa el programa de mielinización al superar el umbral de señalización por neuregulina en la superficie de los axones de pequeño calibre empaquetados por las nmSC. Curiosamente, la desestructuración de los haces de *Remak* mutantes y su

posterior mielinización no parece afectar a la distribución de los diámetros de los axones que los componen (figura R23).

El nervio vago es un nervio relativamente desmielinizado. Si bien en una sección transversal del nervio se puede observar claramente axones de gran calibre normalmente mielinizados, en imágenes de gran aumento se aprecia que la mayor parte de los axones de este nervio son de pequeño calibre y permanecen amielínicos. De hecho, en el microscopio electrónico se observa claramente que a P20, la mayor parte de estos axones están rodeados por el citoplasma de células de Schwann no mielinizantes, formando estructuras semejantes a los haces de *Remak* (figura R19). Curiosamente, en el nervio vago de los animales *NSE-hSMDF^{+/-}* se repiten los mismos rasgos de desestructuración observados en los haces de Remak del nervio ciático (figura R22). Nuestros resultados sugieren que, la mayor parte de los axones de pequeño calibre del nervio vago forman verdaderos haces de Remak, indistinguibles en cuanto a su segregación y empaquetamiento de los haces de Remak del nervio ciático. Además, el hecho de que no se observen más axones individuales mielinizados en estos nervios refuerza el punto de vista de que la sobre-expresión de esta isoforma de neuregulina no es suficiente para inducir la mielinización de forma individual de los axones finos.

Nuestros resultados demuestran por vez primera que es posible reprogramar *in vivo* el destino de una célula de Schwann desde un fenotipo no mielinizante hacia un fenotipo mielinizante. Curiosamente el número de axones mutantes reunidos necesarios para inducir este cambio fenotípico es alto, asemejándose el diámetro total al de un axón mielinizado de tamaño medio. Esto indicaría que la dosis de neuregulina necesaria para inducir este cambio fenotípico en un axón individual de pequeño calibre en el ratón mutante es insuficiente.

Se cree que durante el desarrollo postnatal tanto las células de Schwann mielinizantes como las no mielinizantes se generan a partir de las células de Schwann inmaduras (Jessen y Mirsky 2002; Jessen y Mirsky 2005). Sin embargo, nuestros resultados tomados en conjunto sugieren que las células de Schwann inmaduras y las no mielinizantes son equivalentes y apoyan la idea de que las células de Schwann no mielinizantes son probablemente aquellas

células de Schwann inmaduras que no se han diferenciado al fenotipo mielinizante y permanecen en el adulto formando parte de los haces de Remak o rodeando los axones no mielinizados del nervio vago.

A pesar de presentar una capa de mielina de apariencia normal, la velocidad de conducción en los *Remak* mielinizados no está aumentada (figura R24), de hecho está disminuida. Esta disminución puede ser consecuencia de al menos tres razones. Primero hay que tener en cuenta que únicamente los axones mas externos del haz de Remak están en contacto con la capa de mielina (y solo parcialmente), mientras el resto de axones no están mielinizados. También hay que tener en cuenta que la mielinización no es continua a lo largo del eje longitudinal de los axones (figura R21), lo cual es de por sí suficiente para disminuir dramáticamente la velocidad de conducción, incluso en axones de gran calibre. Y por último, los axones contactan unos con otros ya que no están correctamente segregados por el citoplasma de la nmSC, separación que ha sido demostrado necesaria para obtener una correcta velocidad de conducción (Taveggia, Zanazzi et al. 2005).

Además de tener alterada la velocidad de conducción de las fibras C, la velocidad de conducción de las fibras A en los ratones mutantes está también disminuida. Esta disminución puede ser debida a que el diámetro de los axones mielinizados en los ratones mutantes es menor que en los ratones silvestres (ver figura R21). Sin embargo no podemos descartar que se deba a cambios en los niveles de expresión o distribución de canales de sodio en los nodos originados por alteraciones fenotípicas de las células de Schwann.

Durante el desarrollo de nuestro estudio hemos podido observar que el ratón *NSE-hSMDF^(+/-)* desarrolla algunos de los rasgos fenotípicos característicos de la neurofibromatosis tipo 1. Nuestro transgénico presenta un evidente engrosamiento de los ganglios periféricos y sus raíces (figura R12), como también se observa en los modelos murinos para la neurofibromatosis 1 (Zhu, Ghosh et al. 2002). En estudios a nivel microscópico hemos observado que el engrosamiento es producido por una hiperplasia de las células de Schwann no mielinizantes. Curiosamente, Zheng y colaboradores, observaron que los neurofibromas en el ratón *Nf1^{fllox/-}; POA-cre* (un modelo de

neurofibromatosis tipo 1) son consecuencia de una proliferación descontrolada de las células de Schwann no mielinizantes. Estos autores han demostrado que la deficiencia de *Nf1* no causa hiperproliferación y tumorigenesis en edades tempranas del desarrollo. El único rasgo atípico en estos animales es la degeneración de los haces de Remak. Este grupo ha propuesto que los neurofibromas se desarrollan por una degeneración temprana de los haces de Remak, lo que provoca una hiperproliferación de las células de Schwann no mielinizantes en estadios más tardíos (Zheng, Chang et al. 2008). Nuestros datos sugieren que la hiperactivación de la vía de las neuregulinas en el haz de Remak puede contribuir al desarrollo de neurofibromas a través de un mecanismo similar.

La activación de los receptores erbB ha sido relacionada con el desarrollo de neurofibromatosis previamente. Ling y colaboradores encontraron que la sobreexpresión de EGFR (erbB1) en las células de Schwann provoca la formación de tumores en los nervios periféricos (Ling, Wu et al. 2005). Sin embargo, EGFR no se expresa de manera fisiológica en las células de Schwann, por lo que es difícil entender cómo puede este receptor participar en el desarrollo inicial de los neurofibromas. Sin embargo, los receptores de neuregulinas erbB2 y erbB3 sí son abundantemente expresados en diferentes estadios del desarrollo de este linaje celular. Interesantemente, la activación de estos receptores provoca la activación de la vía de MAPK, la misma vía que supuestamente causa la hiperproliferación y los neurofibromas en las células de Schwann deficientes en *Nf1* (como consecuencia de la sobre-activación de RAS) (Cichowski y Jacks 2001).

Aproximadamente el 5% de los pacientes con neurofibromas plexiformes desarrollan tumores malignos del sistema nervioso periférico muy agresivos. Ha sido descrito recientemente que el 30% de estos tumores en humanos tienen duplicaciones del gen que codifica para erbB2. Como ya hemos indicado con anterioridad, algunos ratones *NSE-hSMDF^{+/-}* desarrollan también tumores en el SNP.

Nuestros datos sugieren pues que la activación de la vía NRG1-erbB podría estar implicada no solo en el desarrollo de neurofibromas sino también en el de sus tumores malignos asociados. Con el objeto de explorar este punto,

hemos comenzado a realizar experimentos que nos permitan conocer si las vías de *Nf1-RAS* y *NRG1-erbB* actúan de manera sinérgica en el desarrollo de tumores del SNP.

Los cruces de ratones mutantes de *Nf1*^(+/-) y los ratones *NSE-hSMDF*^(+/-) no indican por el momento, sinergia entre ambas vías. Sin embargo, es cierto que los datos no son suficientes, al tener todavía muy pocos ratones con una edad superior a las 30 semanas. Estos cruces están siendo todavía seguidos en nuestro laboratorio. Sorprendentemente, tampoco hemos observado hasta el momento un aumento en la aparición de tumores en los cruces de *Nf1*^(+/-) y *p53*^(+/-), tal como ha sido observado en trabajos previos (Cichowski, Shih et al. 1999; Vogel, Klesse et al. 1999). Estos autores observan un claro incremento en el número de tumores a partir de las 30 semanas, en los ratones con mutaciones en cromosomas distintos (trans). Es más, la edad de aparición de tumores disminuye en ratones con la mutación en el mismo cromosoma (cis). Puesto que en nuestros cruces no distinguimos entre ambas situaciones, deberíamos esperar al menos un comportamiento semejante al observado en los mutantes en trans. Sin embargo no es así. No sabemos si esta variación se debe a diferencias en los fondos genéticos de los ratones utilizados, o es consecuencia de cierta variación experimental inespecífica. El seguimiento de estos ratones durante más tiempo nos arrojará probablemente luz sobre este punto.

Interesantemente, sí observamos un claro efecto en la aparición de tumores en los cruces entre *NSE-hSMDF*^(+/-) y *p53*^(+/-) (figura R28). En estos, en el 100% de los dobles mutantes desarrollan tumores en los ganglios raquídeos y nervios cervicales antes de los 6 meses de edad. Estos datos sugieren que existe una sinergia entre la ganancia de función de la vía de *Nrg1-erbB* y la pérdida parcial del gen supresor de tumores *p53*. Esta combinación que todos dobles mutantes desarrollen grandes tumores que llegan a presionar la médula provocando parálisis y/o ataxia. Aunque en la actualidad todavía estamos estudiando los mecanismos moleculares que median este efecto cooperativo, es de destacar que la activación de *p53* activa mecanismos del control, como el bloqueo del ciclo celular y la activación del programa de senescencia, que evitan la aparición de tumores cuando se

activan oncogenes como RAS. Es posible que este mismo mecanismo se encargue también de evitar la aparición de tumores en el SNP cuando se produzca una señalización axón-glia de una manera sostenida y/o exagerada.

En conjunto nuestros datos sugieren que la desregulación de la señalización axón-glia pueden contribuir al desarrollo de tumores en el SNP y apuntan hacia este mecanismo como una posible diana terapéutica que ayude a desarrollar nuevos tratamientos para los neurofibromas y sus tumores malignos asociados.





Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer de los resultados presentados en esta tesis, son:

1. La sobre-expresión neuronal *in vivo* de la NRG1 tipo III- β 3 (SMDF) no produce un incremento en el grosor medio de la capa de mielina en el sistema nervioso periférico. Este resultado contrasta con el obtenido por otros autores con la isoforma III- β 1a y sugiere que la señalización yuxtacrina de estas proteínas (exclusiva en las de tipo III) es una condición necesaria pero no suficiente para conferirles la capacidad de controlar el grosor de la capa de mielina en el SNP.
2. En línea con este resultado, la isoforma III- β 3 no produce tampoco un efecto hipermielinizante evidente sobre los axones del SNC.
3. Sin embargo, la sobre-expresión de esta proteína provoca un notable engrosamiento de los ganglios raquídeos y nervios periféricos, objetivable durante el desarrollo postnatal tardío. Este engrosamiento no está relacionado con el aumento en el número de axones ni con el de su volumen.
4. En este trabajo demostramos por vez primera que una neuregulina (SMDF) actúa como un mitógeno *in vivo* para las células de Schwann. Esta conclusión se apoya en el hecho de que en los ratones *NSE-hSMDF^(+/-)* se observa una proliferación incrementada de las células de Schwann durante los primeros días de vida (antes de P14) Esta proliferación aumentada es probablemente consecuencia de la hiperactivación de la vía de RAS/MAPK.
5. La neuregulina tipo III- β 3 sobre-expresada produce una alteración notable en los haces de *Remak*, evitando una correcta segregación de los axones por el citoplasma de la célula de Schwann no mielinizante, y provocando que muchos de estos axones estén en un único bolsillo.

6. La sobre-expresión de SMDF “reprograma” *in vivo* el destino de una célula de Schwann, desde un fenotipo no mielinizante hacia uno mielinizante, e induce la mielinización de todo el haz de Remak como si de un solo axón se tratara.

7. La velocidad de conducción en estos haces de Remak mielinizados no está aumentada, sino disminuida, posiblemente por la alteración en la segregación de los axones.

8. Los nervios periféricos engrosados de los ratones *NSE-hSMDF^(+/-)* a causa de la acumulación de fibras de colágeno en la matriz extracelular y la hiperplasia de las células de Schwann sugieren que la sobre-activación de la vía Nrg1-erbB podría estar implicada en la fisiopatología de la neurofibromatosis y/o en desarrollo de otros tumores del sistema nervioso periférico.

9. La falta de una copia del gen supresor de tumores *p53* coopera con la sobre-activación de la vía de Nrg1-erbB disminuyendo notablemente la edad de aparición de tumores en el SNP e incrementando su penetrancia del 10% al 100%. Este resultado sugiere que los mecanismos de control del ciclo celular por *p53* juegan un papel fundamental evitando el desarrollo de tumores en el SNP, y apunta a ambas vías como posibles dianas terapéuticas para su tratamiento.



Bibliografía

- Alroy, I. and Y. Yarden (1997). "The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions." FEBS Lett **410**(1): 83-6.
- Alroy, I. and Y. Yarden (2000). "Biochemistry of HER2 oncogenesis in breast cancer." Breast Dis **11**: 31-48.
- Atlas, E., M. Cardillo, et al. (2003). "Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells in vivo." Mol Cancer Res **1**(3): 165-75.
- Bao, J., D. Wolpowitz, et al. (2003). "Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain." J Cell Biol **161**(6): 1133-41.
- Barbacci, E. G., B. C. Guarino, et al. (1995). "The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding." J Biol Chem **270**(16): 9585-9.
- Baron, W., B. Metz, et al. (2000). "PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways." Mol Cell Neurosci **15**(3): 314-29.
- Baumann, N. and D. Pham-Dinh (2001). "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." Physiol Rev **81**(2): 871-927.
- Bermingham, J. R., Jr., S. S. Scherer, et al. (1996). "Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration." Genes Dev **10**(14): 1751-62.
- Bhat, N. R. and P. Zhang (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinases in oligodendrocytes." J Neurochem **66**(5): 1986-94.
- Birchmeier, C. and K. A. Nave (2008). "Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation." Glia **56**(14): 1491-7.
- Boyles, J. K., R. E. Pitas, et al. (1985). "Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system." J Clin Invest **76**(4): 1501-13.
- Bradl, M. and H. Lassmann (2010). "Oligodendrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 37-53.
- Bremer, J., F. Baumann, et al. (2010). "Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance." Nat Neurosci **13**(3): 310-8.

- Breuleux, M. (2007). "Role of heregulin in human cancer." Cell Mol Life Sci **64**(18): 2358-77.
- Brinkmann, B. G., A. Agarwal, et al. (2008). "Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system." Neuron **59**(4): 581-95.
- Britsch, S., D. E. Goerich, et al. (2001). "The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development." Genes Dev **15**(1): 66-78.
- Brockes, J. P., G. E. Lemke, et al. (1980). "Purification and preliminary characterization of a glial growth factor from the bovine pituitary." J Biol Chem **255**(18): 8374-7.
- Burden, S. and Y. Yarden (1997). "Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis." Neuron **18**(6): 847-55.
- Busfield, S. J., D. A. Michnick, et al. (1997). "Characterization of a neuregulin-related gene, Don-1, that is highly expressed in restricted regions of the cerebellum and hippocampus." Mol Cell Biol **17**(7): 4007-14.
- Cabedo, H., C. Carteron, et al. (2004). "Oligomerization of the sensory and motor neuron-derived factor prevents protein O-glycosylation." J Biol Chem **279**(32): 33623-9.
- Cabedo, H., C. Luna, et al. (2002). "Molecular determinants of the sensory and motor neuron-derived factor insertion into plasma membrane." J Biol Chem **277**(22): 19905-12.
- Cai, J., Y. Qi, et al. (2005). "Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling." Neuron **45**(1): 41-53.
- Calver, A. R., A. C. Hall, et al. (1998). "Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo." Neuron **20**(5): 869-82.
- Canoll, P. D., J. M. Musacchio, et al. (1996). "GGF/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors." Neuron **17**(2): 229-43.
- Carpenter, G., K. J. Lembach, et al. (1975). "Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts." J Biol Chem **250**(11): 4297-304.

- Carraway, K. L., 3rd, J. L. Weber, et al. (1997). "Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases." Nature **387**(6632): 512-6.
- Carroll, S. L., M. L. Miller, et al. (1997). "Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration." J Neurosci **17**(5): 1642-59.
- Carteron, C., A. Ferrer-Montiel, et al. (2006). "Characterization of a neural-specific splicing form of the human neuregulin 3 gene involved in oligodendrocyte survival." J Cell Sci **119**(Pt 5): 898-909.
- Casci, T. and M. Freeman (1999). "Control of EGF receptor signalling: lessons from fruitflies." Cancer Metastasis Rev **18**(2): 181-201.
- Chang, H., D. J. Riese, 2nd, et al. (1997). "Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene." Nature **387**(6632): 509-12.
- Chen, M. S., O. Bermingham-McDonogh, et al. (1994). "Expression of multiple neuregulin transcripts in postnatal rat brains." J Comp Neurol **349**(3): 389-400.
- Cichowski, K. and T. Jacks (2001). "NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP." Cell **104**(4): 593-604.
- Cichowski, K., T. S. Shih, et al. (1999). "Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1." Science **286**(5447): 2172-6.
- Citri, A., K. B. Skaria, et al. (2003). "The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3." Exp Cell Res **284**(1): 54-65.
- Citri, A. and Y. Yarden (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 505-16.
- Copeland, N. G., N. A. Jenkins, et al. (1993). "A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects." Science **262**(5130): 57-66.
- Corfas, G., D. L. Falls, et al. (1993). "ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, also induces tyrosine phosphorylation of a 185-kDa muscle transmembrane protein." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(4): 1624-8.
- Corfas, G., M. O. Velardez, et al. (2004). "Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions." J Neurosci **24**(42): 9250-60.
- Cosgaya, J. M., J. R. Chan, et al. (2002). "The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination." Science **298**(5596): 1245-8.

- Danovi, D., C. A. Cremona, et al. (2010). "A genetic screen for anchorage-independent proliferation in mammalian cells identifies a membrane-bound neuregulin." PLoS One **5**(7): e11774.
- Deadwyler, G. D., S. Pouly, et al. (2000). "Neuregulins and erbB receptor expression in adult human oligodendrocytes." Glia **32**(3): 304-12.
- Decker, L. and C. ffrench-Constant (2004). "Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival." J Neurosci **24**(15): 3816-25.
- Detering, N. K. and M. A. Wells (1976). "The non-synchronous synthesis of myelin components during early stages of myelination in the rat optic nerve." J Neurochem **26**(2): 253-7.
- Dong, Z., A. Brennan, et al. (1995). "Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors." Neuron **15**(3): 585-96.
- Dong, Z., A. Sinanan, et al. (1999). "Schwann cell development in embryonic mouse nerves." J Neurosci Res **56**(4): 334-48.
- Edgar, J. M. and J. Garbern (2004). "The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved." J Neurosci Res **76**(5): 593-8.
- Edgar, J. M., M. McLaughlin, et al. (2004). "Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia." J Cell Biol **166**(1): 121-31.
- Elder, G. A., V. L. Friedrich, Jr., et al. (2001). "Schwann cells and oligodendrocytes read distinct signals in establishing myelin sheath thickness." J Neurosci Res **65**(6): 493-9.
- Falls, D. L. (2003). "Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions." J Neurocytol **32**(5-8): 619-47.
- Falls, D. L. (2003). "Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies." Exp Cell Res **284**(1): 14-30.
- Falls, D. L., K. M. Rosen, et al. (1993). "ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family." Cell **72**(5): 801-15.
- Feltri, M. L., D. Graus Porta, et al. (2002). "Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons." J Cell Biol **156**(1): 199-209.

- Fernandez, P. A., D. G. Tang, et al. (2000). "Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve." Neuron **28**(1): 81-90.
- Fischbach, G. D. and K. M. Rosen (1997). "ARIA: a neuromuscular junction neuregulin." Annu Rev Neurosci **20**: 429-58.
- Flores, A. I., B. S. Mallon, et al. (2000). "Akt-mediated survival of oligodendrocytes induced by neuregulins." J Neurosci **20**(20): 7622-30.
- Fogarty, M., W. D. Richardson, et al. (2005). "A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord." Development **132**(8): 1951-9.
- Forss-Petter, S., P. Danielson, et al. (1986). "Neuron-specific enolase: complete structure of rat mRNA, multiple transcriptional start sites, and evidence suggesting post-transcriptional control." J Neurosci Res **16**(1): 141-56.
- Forss-Petter, S., P. E. Danielson, et al. (1990). "Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control." Neuron **5**(2): 187-97.
- Fraher, J. P., D. O'Leary, et al. (1990). "Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. 1. Normal animals." Acta Neuropathol **79**(4): 364-74.
- Friede, R. L. (1972). "Control of myelin formation by axon caliber (with a model of the control mechanism)." J Comp Neurol **144**(2): 233-52.
- Friede, R. L. (1986). "Relation between myelin sheath thickness, internode geometry, and sheath resistance." Exp Neurol **92**(1): 234-47.
- Friede, R. L. and R. Bischhausen (1982). "How are sheath dimensions affected by axon caliber and internode length?" Brain Res **235**(2): 335-50.
- Friede, R. L. and T. Samorajski (1967). "Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibers of vagus and sciatic nerves of mice." J Comp Neurol **130**(3): 223-31.
- Fruttiger, M., A. R. Calver, et al. (1996). "PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina." Neuron **17**(6): 1117-31.
- Garbay, B., A. M. Heape, et al. (2000). "Myelin synthesis in the peripheral nervous system." Prog Neurobiol **61**(3): 267-304.
- Garratt, A. N., S. Britsch, et al. (2000). "Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell." Bioessays **22**(11): 987-96.

- Garratt, A. N., O. Voiculescu, et al. (2000). "A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool." J Cell Biol **148**(5): 1035-46.
- Ghislain, J. and P. Charnay (2006). "Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities." EMBO Rep **7**(1): 52-8.
- Goebbels, S., J. H. Oltrogge, et al. (2010). "Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination." J Neurosci **30**(26): 8953-64.
- Goodearl, A. D., J. B. Davis, et al. (1993). "Purification of multiple forms of glial growth factor." J Biol Chem **268**(24): 18095-102.
- Grinspan, J. B., M. A. Marchionni, et al. (1996). "Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins." J Neurosci **16**(19): 6107-18.
- Guenard, V., T. Rosenbaum, et al. (1995). "Effect of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 on Schwann cell proliferation on neurites." Glia **13**(4): 309-18.
- Gutmann, D. H. (2001). "The neurofibromatoses: when less is more." Hum Mol Genet **10**(7): 747-55.
- Guy, P. M., J. V. Platko, et al. (1994). "Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 8132-6.
- Harari, D., E. Tzahar, et al. (1999). "Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase." Oncogene **18**(17): 2681-9.
- Herbarth, B., V. Pingault, et al. (1998). "Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5161-5.
- Higashiyama, S., M. Horikawa, et al. (1997). "A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4." J Biochem **122**(3): 675-80.
- Hijazi, M. M., E. W. Thompson, et al. (2000). "Heregulin regulates the actin cytoskeleton and promotes invasive properties in breast cancer cell lines." Int J Oncol **17**(4): 629-41.

- Ho, W. H., M. P. Armanini, et al. (1995). "Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons." J Biol Chem **270**(44): 26722.
- Holmes, W. E., M. X. Sliwkowski, et al. (1992). "Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2." Science **256**(5060): 1205-10.
- Huijbregts, R. P., K. A. Roth, et al. (2003). "Hypertrophic neuropathies and malignant peripheral nerve sheath tumors in transgenic mice overexpressing glial growth factor beta3 in myelinating Schwann cells." J Neurosci **23**(19): 7269-80.
- Jacks, T., T. S. Shih, et al. (1994). "Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1." Nat Genet **7**(3): 353-61.
- Jaegle, M., M. Ghazvini, et al. (2003). "The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development." Genes Dev **17**(11): 1380-91.
- Jessell, T. M., R. E. Siegel, et al. (1979). "Induction of acetylcholine receptors on cultured skeletal muscle by a factor extracted from brain and spinal cord." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 5397-401.
- Jessen, K. R., A. Brennan, et al. (1994). "The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves." Neuron **12**(3): 509-27.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky (1999). "Why do Schwann cells survive in the absence of axons?" Ann N Y Acad Sci **883**: 109-15.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky (2002). "Signals that determine Schwann cell identity." J Anat **200**(4): 367-76.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky (2005). "The origin and development of glial cells in peripheral nerves." Nat Rev Neurosci **6**(9): 671-82.
- Jessen, K. R., L. Morgan, et al. (1990). "Three markers of adult non-myelinating Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions." Development **109**(1): 91-103.
- Jones, R. B., A. Gordus, et al. (2006). "A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays." Nature **439**(7073): 168-74.

- Kessaris, N., M. Fogarty, et al. (2006). "Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage." Nat Neurosci **9**(2): 173-9.
- Klamt, C., T. Hummel, et al. (2001). "Glial cell development in Drosophila." Int J Dev Neurosci **19**(4): 373-8.
- Kollias, G., E. Spanopoulou, et al. (1987). "Differential regulation of a Thy-1 gene in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(6): 1492-6.
- Kramer, R., N. Bucay, et al. (1996). "Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4833-8.
- Kraus, M. H., W. Issing, et al. (1989). "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9193-7.
- Laule, C., I. M. Vavasour, et al. (2007). "Magnetic resonance imaging of myelin." Neurotherapeutics **4**(3): 460-84.
- Le, L. Q. and L. F. Parada (2007). "Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs." Oncogene **26**(32): 4609-16.
- Le, N., R. Nagarajan, et al. (2005). "Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2596-601.
- Lee, K. F., H. Simon, et al. (1995). "Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development." Nature **378**(6555): 394-8.
- Levi, A. D., R. P. Bunge, et al. (1995). "The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation." J Neurosci **15**(2): 1329-40.
- Ling, B. C., J. Wu, et al. (2005). "Role for the epidermal growth factor receptor in neurofibromatosis-related peripheral nerve tumorigenesis." Cancer Cell **7**(1): 65-75.
- Loeb, J. A., T. S. Khurana, et al. (1999). "Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development." Development **126**(4): 781-91.

- Lupu, R., R. Colomer, et al. (1990). "Direct interaction of a ligand for the erbB2 oncogene product with the EGF receptor and p185erbB2." Science **249**(4976): 1552-5.
- Mahanthappa, N. K., E. S. Anton, et al. (1996). "Glial growth factor 2, a soluble neuregulin, directly increases Schwann cell motility and indirectly promotes neurite outgrowth." J Neurosci **16**(15): 4673-83.
- Marchionni, M. A., A. D. Goodearl, et al. (1993). "Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system." Nature **362**(6418): 312-8.
- Maurel, P. and J. L. Salzer (2000). "Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity." J Neurosci **20**(12): 4635-45.
- McClatchey, A. I. (2007). "Neurofibromatosis." Annu Rev Pathol **2**: 191-216.
- Meier, C., E. Parmantier, et al. (1999). "Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB." J Neurosci **19**(10): 3847-59.
- Meiners, S., V. Brinkmann, et al. (1998). "Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells." Oncogene **16**(1): 9-20.
- Meyer, D. and C. Birchmeier (1995). "Multiple essential functions of neuregulin in development." Nature **378**(6555): 386-90.
- Meyer, D., T. Yamaai, et al. (1997). "Isoform-specific expression and function of neuregulin." Development **124**(18): 3575-86.
- Michailov, G. V., M. W. Sereda, et al. (2004). "Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness." Science **304**(5671): 700-3.
- Mirsky, R., K. R. Jessen, et al. (2002). "Schwann cells as regulators of nerve development." J Physiol Paris **96**(1-2): 17-24.
- Mirsky, R., A. Woodhoo, et al. (2008). "Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation." J Peripher Nerv Syst **13**(2): 122-35.
- Mitrecic, D., M. Huzak, et al. (2005). "An improved method for determination of gene copy numbers in transgenic mice by serial dilution curves obtained by real-time quantitative PCR assay." J Biochem Biophys Methods **64**(2): 83-98.

- Montero, J. C., R. Rodriguez-Barrueco, et al. (2008). "Neuregulins and cancer." Clin Cancer Res **14**(11): 3237-41.
- Morris, J. K., W. Lin, et al. (1999). "Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development." Neuron **23**(2): 273-83.
- Morris, R. J., P. C. Barber, et al. (1983). "The distribution of Thy-1 antigen in the P.N.S. of the adult rat." J Neurocytol **12**(6): 1017-39.
- Morrison, S. J., S. E. Perez, et al. (2000). "Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells." Cell **101**(5): 499-510.
- Murinson, B. B. and J. W. Griffin (2004). "C-fiber structure varies with location in peripheral nerve." J Neuropathol Exp Neurol **63**(3): 246-54.
- Nave, K. A. and J. L. Salzer (2006). "Axonal regulation of myelination by neuregulin 1." Curr Opin Neurobiol **16**(5): 492-500.
- Nave, K. A. and M. H. Schwab (2005). "Glial cells under remote control." Nat Neurosci **8**(11): 1420-2.
- Nave, K. A. and B. D. Trapp (2008). "Axon-glial signaling and the glial support of axon function." Annu Rev Neurosci **31**: 535-61.
- Ndubaku, U. and M. E. de Bellard (2008). "Glial cells: old cells with new twists." Acta Histochem **110**(3): 182-95.
- Nickols, J. C., W. Valentine, et al. (2003). "Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation." Nat Neurosci **6**(2): 161-7.
- Nussbaum, J. L., N. Neskovic, et al. (1969). "A study of lipid components in brain of the 'Jimpy' mouse, a mutant with myelin deficiency." J Neurochem **16**(3): 927-34.
- Ogata, T., S. Iijima, et al. (2004). "Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control Schwann cell myelination." J Neurosci **24**(30): 6724-32.
- Peles, E., S. S. Bacus, et al. (1992). "Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells." Cell **69**(1): 205-16.
- Peltonen, J., S. Jaakkola, et al. (1988). "Cellular differentiation and expression of matrix genes in type 1 neurofibromatosis." Lab Invest **59**(6): 760-71.

- Pinkas-Kramarski, R., M. Shelly, et al. (1996). "Neu differentiation factor/neuregulin isoforms activate distinct receptor combinations." J Biol Chem **271**(32): 19029-32.
- Plowman, G. D., J. M. Green, et al. (1993). "Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4." Nature **366**(6454): 473-5.
- Plowman, G. D., G. S. Whitney, et al. (1990). "Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 4905-9.
- Poliak, S. and E. Peles (2003). "The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier." Nat Rev Neurosci **4**(12): 968-80.
- Raabe, T. D., D. R. Clive, et al. (1996). "Cultured neonatal Schwann cells contain and secrete neuregulins." J Neurosci Res **46**(2): 263-70.
- Raabe, T. D., S. Suy, et al. (1997). "Effect of neu differentiation factor isoforms on neonatal oligodendrocyte function." J Neurosci Res **50**(5): 755-68.
- Raff, M. C., E. Abney, et al. (1978). "Schwann cell growth factors." Cell **15**(3): 813-22.
- Riethmacher, D., E. Sonnenberg-Riethmacher, et al. (1997). "Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor." Nature **389**(6652): 725-30.
- Rosenbaum, C., S. Karyala, et al. (1997). "Schwann cells express NDF and SMDF/n-ARIA mRNAs, secrete neuregulin, and show constitutive activation of erbB3 receptors: evidence for a neuregulin autocrine loop." Exp Neurol **148**(2): 604-15.
- Salzer, J. L. (2003). "Polarized domains of myelinated axons." Neuron **40**(2): 297-318.
- Salzer, J. L. (2008). "Switching myelination on and off." J Cell Biol **181**(4): 575-7.
- Sanguinetti, C., F. Greco, et al. (1991). "The ultrastructure of schwannoma and neurofibroma of the peripheral nerves." Ital J Orthop Traumatol **17**(2): 237-46.
- Schechter, A. L., M. C. Hung, et al. (1985). "The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor." Science **229**(4717): 976-8.

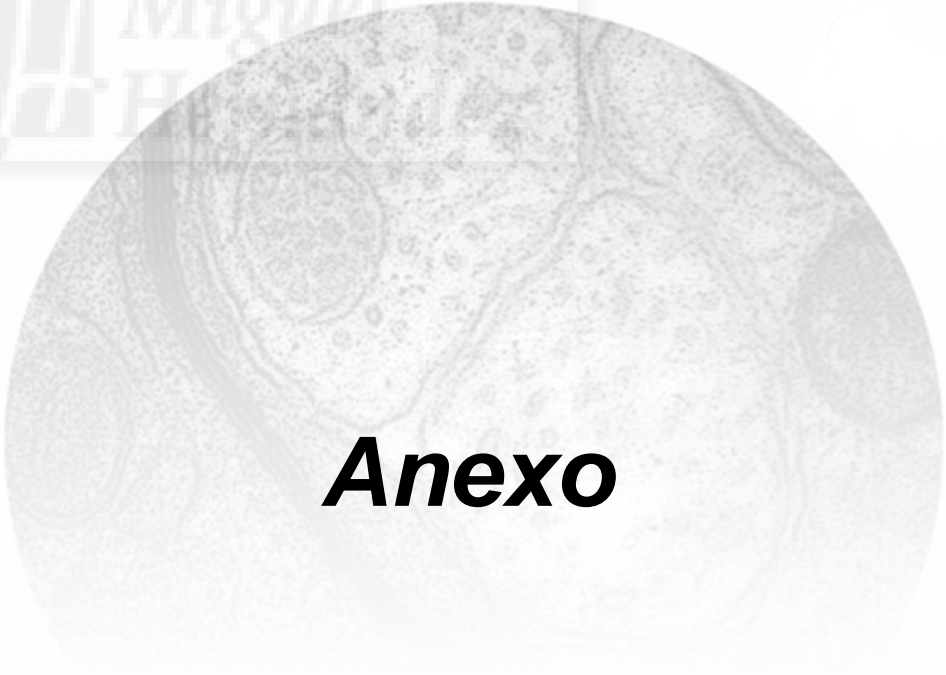
- Scherer, S. S. and E. J. Arroyo (2002). "Recent progress on the molecular organization of myelinated axons." J Peripher Nerv Syst **7**(1): 1-12.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-25.
- Schulze, W. X., L. Deng, et al. (2005). "Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family." Mol Syst Biol **1**: 2005 0008.
- Schweigreiter, R., B. I. Roots, et al. (2006). "Understanding myelination through studying its evolution." Int Rev Neurobiol **73**: 219-73.
- Semba, K., N. Kamata, et al. (1985). "A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(19): 6497-501.
- Shah, N. M., A. K. Groves, et al. (1996). "Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members." Cell **85**(3): 331-43.
- Shah, N. M., M. A. Marchionni, et al. (1994). "Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate." Cell **77**(3): 349-60.
- Steinthorsdottir, V., H. Stefansson, et al. (2004). "Multiple novel transcription initiation sites for NRG1." Gene **342**(1): 97-105.
- Sternberg, P. W., G. Lesa, et al. (1995). "LET-23-mediated signal transduction during *Caenorhabditis elegans* development." Mol Reprod Dev **42**(4): 523-8.
- Stewart, H. J., P. A. Eccleston, et al. (1991). "Interaction between cAMP elevation, identified growth factors, and serum components in regulating Schwann cell growth." J Neurosci Res **30**(2): 346-52.
- Stove, C. and M. Bracke (2004). "Roles for neuregulins in human cancer." Clin Exp Metastasis **21**(8): 665-84.
- Svaren, J. and D. Meijer (2008). "The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells." Glia **56**(14): 1541-51.
- Syed, N., K. Reddy, et al. (2010). "Soluble neuregulin-1 has bifunctional, concentration-dependent effects on Schwann cell myelination." J Neurosci **30**(17): 6122-31.

- Syroid, D. E., P. R. Maycox, et al. (1996). "Cell death in the Schwann cell lineage and its regulation by neuregulin." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(17): 9229-34.
- Syroid, D. E., T. S. Zorick, et al. (1999). "A role for insulin-like growth factor-I in the regulation of Schwann cell survival." J Neurosci **19**(6): 2059-68.
- Tang, C. K., C. Perez, et al. (1996). "Involvement of heregulin-beta2 in the acquisition of the hormone-independent phenotype of breast cancer cells." Cancer Res **56**(14): 3350-8.
- Taveggia, C., M. L. Feltri, et al. (2010). "Signals to promote myelin formation and repair." Nat Rev Neurol **6**(5): 276-87.
- Taveggia, C., G. Zanazzi, et al. (2005). "Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons." Neuron **47**(5): 681-94.
- Theos, A. and B. R. Korf (2006). "Pathophysiology of neurofibromatosis type 1." Ann Intern Med **144**(11): 842-9.
- Topilko, P., G. Levi, et al. (1997). "Differential regulation of the zinc finger genes Krox-20 and Krox-24 (Egr-1) suggests antagonistic roles in Schwann cells." J Neurosci Res **50**(5): 702-12.
- Topilko, P., S. Schneider-Maunoury, et al. (1994). "Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system." Nature **371**(6500): 796-9.
- Tsai, M. S., A. E. Hornby, et al. (2000). "Expression and function of CYR61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies." Cancer Res **60**(20): 5603-7.
- Tsai, M. S., L. A. Shamon-Taylor, et al. (2003). "Blockage of heregulin expression inhibits tumorigenicity and metastasis of breast cancer." Oncogene **22**(5): 761-8.
- Ullrich, A., L. Coussens, et al. (1984). "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells." Nature **309**(5967): 418-25.
- Vartanian, T., G. Fischbach, et al. (1999). "Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 731-5.
- Vartanian, T., A. Goodearl, et al. (1997). "Axonal neuregulin signals cells of the oligodendrocyte lineage through activation of HER4 and Schwann cells through HER2 and HER3." J Cell Biol **137**(1): 211-20.

- Vega, J. A., C. Rodriguez, et al. (1990). "Neuron-specific enolase (NSE)-like and neurofilament protein (NFP)-like immunoreactivities in the rat dorsal root ganglia and sciatic nerve." Cell Mol Biol **36**(5): 537-46.
- Vogel, K. S., L. J. Klesse, et al. (1999). "Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1." Science **286**(5447): 2176-9.
- Waterman, H., I. Alroy, et al. (1999). "The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing." EMBO J **18**(12): 3348-58.
- Webster, H. D. (1971). "The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves." J Cell Biol **48**(2): 348-67.
- Wen, D., E. Peles, et al. (1992). "Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit." Cell **69**(3): 559-72.
- Wen, D., S. V. Suggs, et al. (1994). "Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors." Mol Cell Biol **14**(3): 1909-19.
- Wilson, G. F. and S. Y. Chiu (1993). "Mitogenic factors regulate ion channels in Schwann cells cultured from newborn rat sciatic nerve." J Physiol **470**: 501-20.
- Woldeyesus, M. T., S. Britsch, et al. (1999). "Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development." Genes Dev **13**(19): 2538-48.
- Wolpowitz, D., T. B. Mason, et al. (2000). "Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses." Neuron **25**(1): 79-91.
- Woodhoo, A. and L. Sommer (2008). "Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve." Glia **56**(14): 1481-90.
- Yao, J., S. Xiong, et al. (2001). "Multiple signaling pathways involved in activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by heregulin-beta1 in human breast cancer cells." Oncogene **20**(56): 8066-74.
- Yin, X., T. O. Crawford, et al. (1998). "Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons." J Neurosci **18**(6): 1953-62.

- Zhang, D., M. X. Sliwkowski, et al. (1997). "Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9562-7.
- Zheng, H., L. Chang, et al. (2008). "Induction of abnormal proliferation by nonmyelinating schwann cells triggers neurofibroma formation." Cancer Cell **13**(2): 117-28.
- Zhu, Y., P. Ghosh, et al. (2002). "Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment." Science **296**(5569): 920-2.
- Zorick, T. S. and G. Lemke (1996). "Schwann cell differentiation." Curr Opin Cell Biol **8**(6): 870-6.





Anexo

Sustained Axon–Glial Signaling Induces Schwann Cell Hyperproliferation, Remak Bundle Myelination, and Tumorigenesis

Jose A. Gomez-Sanchez,^{1,3} Mikel Lopez de Armentia,² Rafael Lujan,⁴ Nicoletta Kessarlis,⁵ William D. Richardson,⁵ and Hugo Cabedo^{1,3}

¹Biology of Myelin Diseases Laboratory and ²Synaptic Plasticity and Regulation of Gene Expression Laboratory, Instituto de Neurociencias de Alicante, Universitat Miguel Hernandez–Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 03550 Sant Joan, Alicante, Spain, ³Unidad de Investigación del Hospital de Sant Joan, 03550 Sant Joan, Alicante, Spain, ⁴Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha, 02006 Albacete, Spain, and ⁵Wolfson Institute for Biomedical Research, University College London, WC1E 6BT London, United Kingdom

Type III neuregulins exposed on axon surfaces control myelination of the peripheral nervous system. It has been shown, for example, that threshold levels of type III β 1a neuregulin dictate not only the myelination fate of axons but also myelin thickness. Here we show that another neuregulin isoform, type III- β 3, plays a distinct role in myelination. Neuronal overexpression of this isoform in mice stimulates Schwann cell proliferation and dramatically enlarges peripheral nerves and ganglia—which come to resemble plexiform neurofibromas—but have no effect on myelin thickness. The nerves display other neurofibroma-like properties, such as abundant collagen fibrils and abundant dissociated Schwann cells that in some cases produce big tumors. Moreover, the organization of Remak bundles is dramatically altered; the small-caliber axons of each bundle are no longer segregated from one another within the cytoplasm of a nonmyelinating Schwann cell but instead are close packed and the whole bundle wrapped as a single unit, frequently by a compact myelin sheath. Because Schwann cell hyperproliferation and Remak bundle degeneration are early hallmarks of type I neurofibromatosis, we suggest that sustained activation of the neuregulin pathway in Remak bundles can contribute to neurofibroma development.

Introduction

Compact myelin is a vertebrate-specific adaptation that dramatically increases nerve conduction velocity. The formation of myelin by Schwann cells in the peripheral nervous system (PNS) is primarily dependent on axon-derived signals (for review, see Sherman and Brophy, 2005). Recently, it was shown that Neuregulin 1 (*NRG1*) gene products expressed in PNS neurons are pivotal for the survival and proliferation of Schwann cell lineage (Levi et al., 1995; Morrissey et al., 1995; Wolpowitz et al., 2000). It was also elegantly demonstrated that later, axon surface-exposed neuregulins provide instructive signals for the myelination of peripheral neurons (Michailov et al., 2004; Sherman and Brophy, 2005; Taveggia et al., 2005).

Neuregulins are a group of cell–cell signaling molecules that act as ligands of ErbB receptor tyrosine kinases. *NRG1* is a highly

spliced gene with >15 isoforms, each containing an epidermal growth factor-like domain that is essential for receptor binding and activation. According to the structure of their N-terminal domains, three main types of splicing products (type I–III) with specific biological roles have been described (Falls, 2003). It has been shown that only type III isoforms (characterized by a cysteine-rich domain) are involved in the control of PNS myelination (Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005). Type III isoforms control not only myelination but also the ensheathment of small-diameter axons and their segregation by the cytoplasm of nonmyelinating Schwann cells (nmSC) in so-called Remak bundles (Taveggia et al., 2005).

Two different neuregulin type III isoforms have been so far described, type III- β 1a and type III- β 3 (Ho et al., 1995; Schroering and Carey, 1998; Falls, 2003). Gain-of-function studies on the role the type III isoforms in myelination have been exclusively conducted with the type III- β 1a splicing form. However, the type III- β 3 isoform (also known as SMDF, for sensory and motor-neuron derived factor) is also highly expressed in PNS neurons, suggesting that it could have a role in myelin development. To determine the role of this isoform in myelination, we have generated transgenic mice that overexpress human SMDF (hSMDF) under the control of the rat neuron-specific enolase (NSE) promoter. We show that, although SMDF overexpression has no major effects on myelin thickness around individual large-diameter axons, it has dramatic effects on the structure of the Remak bundles. The small-caliber axons in these bundles are not

Received April 11, 2009; revised July 20, 2009; accepted July 28, 2009.

This work was supported by the Spanish Ministry of Health "Instituto de Salud Carlos III" Grant PI05/0535 and "Conselleria de Salut de la Generalitat Valenciana" Grant AP-002/06 (H.C.). This work was also partially supported by Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación Grant CSD2007-00023. J.A.G. was supported by a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III, PI05/0535). We thank A. Barco for kindly hosting the electrophysiological experiments. We thank Pedro Morenilla-Ayala, Consuelo Martínez-Moratalla, Ulla Dennehy, and Matthew Grist for technical assistance.

Correspondence should be addressed to Hugo Cabedo, Instituto de Neurociencias de Alicante Universitat Miguel Hernández–Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda Santiago Ramon y Cajal sn, 03550 Sant Joan, Alicante, Spain. E-mail: hugo.cabedo@umh.es.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1753-09.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/2911304-12\$15.00/0

segregated one from another within the Schwann cell cytoplasm as they normally are but remain as a close-packed bundle that is ensheathed as a single entity. Strikingly, the ensheathing Schwann cells in mutant Remak bundles elaborate a compact myelin sheath around the exterior of the axon bundle. We also show that overexpression of SMDF provokes a dramatic proliferation of nmSC, suggesting that neuregulin is an *in vivo* mitogenic signal for these cells. Akin to type I neurofibromatosis (Ling et al., 2005; Zheng et al., 2008), mutant nerves show increased deposits of collagen fibrils in the extracellular space and, in some cases, develop big tumors, suggesting that neuregulin overexpression in the small-sized axons of Remak bundles could be involved in the development of neurofibroma and other peripheral nerve tumors.

Materials and Methods

Generation of NSE-hSMDF transgenic mice. All the procedures involving animals were performed following European Union and United Kingdom guidelines. The cDNA encoding for the human SMDF was directionally cloned in the *Xba*I, *Not*I restriction sites of the NSE-mouse platelet-derived growth factor alpha chain plasmid (Fruttiger et al., 1996). The sequence of the construct was verified by DNA sequencing. The NSE promoter, hSMDF cDNA, and simian virus 40 poly(A) were excised with *Eco*RI and injected into fertilized C57BL/6 hybrid mouse oocytes. These were transferred into pseudopregnant female mice. Two founders, able to transmit and express the transgene, were used to establish two transgenic mouse lines, *NSE-hSMDF#1* and *NSE-hSMDF#2*. Mice were genotyped by PCR using human-specific SMDF primers (sense, 5'-GAGTCTGCAGTCTCAGACCT; antisense, 5'-GATGGGGACAATGCAGATT).

mRNA detection and quantification by reverse transcription and quantitative PCR. To detect and quantify gene expression, animals were killed, the sciatic nerve was dissected, and total RNA was isolated using Purelink Micro-To-Midi kit according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen). Genomic DNA was removed by incubation with RNase-free DNase I (Fermentas), and RNA was primed with random hexamers and retrotranscribed to cDNA with SuperScript II Reverse transcriptase (Invitrogen). Control reactions were performed omitting retrotranscriptase. The same primers used for genotyping were used for reverse transcription (RT)-PCR. To control the quality of the cDNA, housekeeping mRNA (SREBP2) was amplified (sense, 5'-AAGTCTGGCGTTCTGAGGAA; antisense, 5'-CCAGGAAGGTGAGGACACAT). Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using the Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System and Platinum SYBR_Green qPCR SupermixUDG (Invitrogen). To avoid genomic amplification, PCR primers were designed to fall into separate exons flanking a large intron. Reactions were performed in duplicates of three different dilutions, and threshold cycle values were normalized to the housekeeping gene 18S. The specificity of the products was determined by melting curve analysis and gel electrophoresis. The ratio of the relative expression for each gene to 18S was calculated by using the $2^{-\Delta CT}$ formula (Table 1).

To quantify the amount of mRNA for SMDF in peripheral neurons, qPCR was performed with primers able to amplify both the human and mouse SMDF (SMDF human/mouse sense, 5'-GCC CAA ATG AGT TTA CTG GTG; SMDF human/mouse antisense, 5'-GCT CCT ATT CAG GCA GAG ACA G). Results were normalized to 18S.

Calculating the number of integrated copies. The number of transgene copies was evaluated as described previously (Mitrecic et al., 2005; Haurogne et al., 2007). Briefly, genomic DNA was extracted from tail biopsies using standard protocols, and DNA concentrations were determined with an UV spectrophotometer (Nanodrop). DNA stock solutions at 50 ng/ μ l were prepared, and the actual concentration was reevaluated (mean of five measurements). According to this result, two dilutions were prepared (6.25 and 3.13 ng/ μ l of genomic DNA). For qPCR reaction, we always used a 2 μ l of sample of each dilution. The primer sequences used for the transgene were as follows: sense, 5'-GAGTCTGCAGTCTCAGACCT; antisense, 5'-GATGGGGACAATGCAGATT. A fragment of

Table 1. Primers used in this study to amplify the myelin related genes

Primer	GenBank accession number		Sequence (5' → 3')
MBP	NM_0100777	Sense	ATCCAAGTACCTGGCCACAG
		Antisense	CCTGTACCCTAAAGAAAGC
P0	NM_008623	Sense	ACCAGACATAGTGGGCAAGACCTC
		Antisense	AAGAGCAACAGCAGCAACAGACC
CNPase	NM_009923	Sense	TGCTGCACTGTACAACCAATTC
		Antisense	GTGTCAAAAGAGAGCAGAGATGG
HMGR	NM_008255	Sense	TGGATCGAAGGACGAGGAAAG
		Antisense	GAATTACGTCAACCATAGCTCCG
18S	NR_003278	Sense	CGGCTACCACATCCAAGGAA
		Antisense	GCTGGAATTACCGCGGT

the same size (~250 bp) was also amplified from the mGJA5 housekeeping gene (GenBank accession number NM_008121; primer sense, 5'-GCCTATGAGTACCCAGTAGCCG; antisense, 5'-CGTGGGCCTCGAAACATAAC). The number of transgene copies was calculated using the $2^{-\Delta CT}$ formula.

In situ hybridization. Antisense RNA probes for *in situ* hybridization were prepared from human SMDF cDNA cloned in pcDNA3 (Cabelo et al., 2002). *In situ* hybridization was performed as described previously (Fruttiger et al., 1999).

Immunoblotting and lectin binding. Tissues were homogenized at 4°C in radioimmunoprecipitation assay buffer (1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 5 mM EGTA) containing protease inhibitors (Complete tablets; Roche) and phosphatase inhibitors (50 mM sodium fluoride and 0.2 mM sodium vanadate). Protein concentrations were determined by the BCA method (Pierce). For Western blotting, 6–15 μ g of total protein was subjected to SDS-PAGE and blotted onto Protran nitrocellulose membrane (Whatman Schleicher and Schuell). Membranes were incubated overnight at 4°C with the indicated specific primary antibody, washed and incubated with secondary antibodies, and developed with ECLplus (GE Healthcare). The primary antibodies used were as follows: mouse monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:1000; Millipore Bioscience Research Reagents) and anti- β -actin antibodies (1:2000; Sigma); rabbit polyclonal anti-mitogen-activated protein kinase (MAPK), anti-phospho-MAPK p44-42, anti-AKT, and anti-phospho-AKT (Ser473) antibodies (1:1000; Cell Signaling Technology); rabbit polyclonal anti-heregulin β 3 and anti-ErbB3 antibodies (1:500; Santa Cruz Biotechnologies); and anti-phospho-Histone H3 (pSer10) (1:200; Sigma) and anti-Krox-20 (Egr2) rabbit polyclonal antibodies (1:100; Covance). Goat polyclonal antibodies were anti-MBP (clone D-18) (1:500; Santa Cruz Biotechnologies) and anti-apolipoprotein E (ApoE) (1:500; Millipore Bioscience Research Reagents). The secondary antibodies were conjugated with horseradish peroxidase (1:2000; Sigma). For lectin binding, tissues were lysed with 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.4% sodium deoxycholate, 0.3% SDS, and 1% Nonidet P-40, and extracts were incubated with 80 μ l of wheat germ agglutinin-agarose lectin, extensively washed with lysis buffer, and analyzed by immunoblotting.

Immunohistochemistry. Mice were killed, and sciatic nerves were dissected, fixed overnight in 4% paraformaldehyde, and cryoprotected by sequential immersion in 5, 15, and 30% sucrose in PBS at 4°C. Fixed nerves were embedded in O.C.T. (TissueTek; Sakura) and frozen on dry ice. Longitudinal or transversal nerve sections were blocked for 2 h in 5% goat serum and 0.3% Triton X-100 in PBS. Primary antibodies (anti-S100 at 1:400 and anti-GFAP at 1:500) were diluted in 1% goat serum and 0.3% Triton X-100 in PBS and incubated at 4°C. Sections were then washed with PBS, and detection was performed using the appropriate fluorescent secondary antibodies (AlexaFluor 594 anti-mouse, AlexaFluor 488 anti-rabbit, 1:700; Invitrogen) for 1 h. Nuclei were counterstained with bis-benzimide (Hoechst nuclear stain) in PBS. Samples were mounted in Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates). Anti-Krox-20 immunohistochemistry was performed as described by Le et al. (2005).

Cell proliferation analysis. Cell proliferation was measured by bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma) incorporation. Transgenic mice and littermates [postnatal day 5 (P5) or P14] were administered four doses of

BrdU (50 mg/kg in PBS) intraperitoneally at 2 h intervals. Sciatic nerves were subsequently dissected, and cells were disaggregated and plated on coverslips. After cell attachment (8–12 h), cells were processed for BrdU immunostaining. Briefly, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min, washed in PBS, treated with 2N HCl for 30 min at 37°C, washed in borate buffer, pH 8.3, and PBS, and blocked in PBS containing 0.5% Triton X-100 and 5% goat serum. Processed cells were incubated with a mouse anti-BrdU (1:500; Sigma) and a rabbit anti-S100 (1:400; Sigma) antibody for 2 h at 37°C and then washed with PBS. Detection was performed using fluorescent secondary antibodies (AlexaFluor 546 anti-mouse and AlexaFluor 488 anti-rabbit, 1:1000). Samples were mounted in Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates). To calculate the mitotic index, anti-phospho-Histone H3 (1:200) immunohistochemistry was used.

Toluidine blue staining and transmission electron microscopy. Mice were profoundly anesthetized by intraperitoneal injection of 40 mg/kg ketamine and 30 mg/kg xylazine and then intracardially perfused with 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Tissues were dissected and immersed in the same fixative solution at 4°C overnight, washed in phosphate buffer, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol series, and embedded in epoxy resin (Durcupan). Semithin sections were cut with a glass knife at 1–3 μ m and stained with toluidine blue. Images were obtained with a 63 \times objective in an inverted microscope (Nikon) and digitalized with MetaMorph 7.1 software (Molecular Devices). For electron microscopy, ultrathin sections (70–90 nm) were cut on an ultramicrotome (Reichert Ultracut E; Leica) and collected on 200-mesh nickel grids. Staining was performed on drops of 1% aqueous uranyl acetate, followed by Reynolds's lead citrate. Ultrastructural analyses were performed in a Jeol-1010 electron microscope. *g*-Ratio and axon perimeter were calculated using NIH ImageJ. Electron microscopy images were used for calculating the *g*-ratio. Axon perimeter measurements were performed on images taken on a light microscope. At least 100 randomly selected axons were analyzed per animal. Three or more animals were used per genotype.

Gomori's staining. Sciatic nerves were sectioned longitudinally (10 μ m thickness) and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, washed in water, stained in Gomori's Trichrome Stain LG for 5 min, and washed again with 0.5% acetic acid for 1 min. Then, slides were sequentially dehydrated in 70, 95, and 100% alcohol series, cleared in xylene, and mounted with Permount (Thermo Fisher Scientific). Images were obtained with AxioCamHRC (Carl Zeiss) in DM5000R microscopes (Leica) under a 20 \times objective.

Electrophysiology. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 40 mg/kg ketamine and 30 mg/kg xylazine and then perfused with oxygenated (95% O₂/5% CO₂) saline containing the following (in mM): 133 NaCl, 16.3 NaHCO₃, 1.3 NaH₂PO₄, 3.6 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 CaCl₂, and 7.8 glucose. Sciatic nerves were dissected and placed in a recording chamber superfused with the same solution. Electrical stimuli were applied using a suction electrode at one end of the nerve, and compound action potentials were recorded with a pipette filled with 1 M NaCl (5 M Ω) at the other end. Signals were recorded using a MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices), filtered at 10 kHz and digitized at 20 kHz (Digidata1320A; Molecular Devices), and analyzed with AxoGraph X 1.0 (AxoGraph Scientific). To increase the signal-to-noise ratio, 40 sweeps were averaged.

Results

Neuronal overexpression of type III- β 3 NRG1: NSE-SMDF transgenic mice

Although it is well established that overexpression of the type III- β 1a isoform of Neuregulin 1 increases myelin thickness in the PNS, the effects of type III- β 3 isoform overexpression have not been yet determined. To explore this point, we produced transgenic mice expressing the human type III- β 3 neuregulin in neurons, under transcriptional control of a 1.8 kb NSE promoter fragment from rat (Fig. 1*a*), which has been used previously to target transgene expression to postnatal neurons (Forss-Petter et al., 1990; Fruttiger et al., 1996; Calver et al., 1998). Two founder

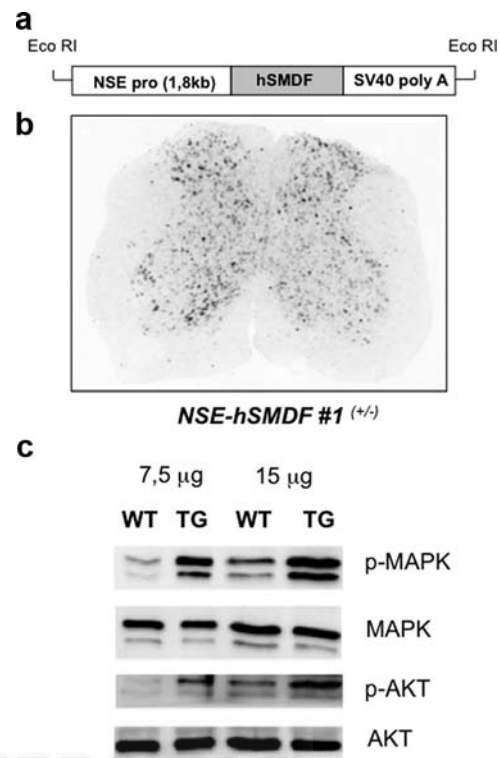


Figure 1. Strategy to overexpress type III- β 3 neuregulin in neurons. *a*, To drive the expression of type III- β 3 neuregulin into CNS and PNS neurons, the cDNA encoding for the human SMDF was cloned under the 1.8 kb promoter of the rat NSE and microinjected into fertilized mouse oocytes (see Material and Methods). *b*, *In situ* hybridization with a human *hSMDF* probe shows that the transgene is expressed in neurons (gray matter) but not in glial cells (white matter) in the *NSE-SMDF#1*^{+/-} mice. *c*, The overexpression of *hSMDF* induces the sustained activation of the MAPK and PI3K pathways in the PNS. Protein extracts from P20 sciatic nerves were submitted to SDS-PAGE and blotted with anti-phospho-MAPK kinase or anti-phospho-Akt-specific antibodies. The incubation with anti-MAPK and anti-Akt (total protein) illustrates that the increase in phospho-immunoreactivity was not caused by changes in the amount of protein. WT, Wild type; TG, transgenic.

lines (#1 and #2) were derived that contained ~24 and ~7 transgene copies per genome, respectively (supplemental Fig. S1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Both lines were fertile and developed no obvious phenotype during the first few months of life. *In situ* hybridization with a probe specific for *hSMDF* showed that both lines expressed the *NSE-hSMDF* transgene in cells of the spinal cord gray matter but not white matter, consistent with neuron-specific expression (Fig. 1*b*) (supplemental Fig. S2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Unless otherwise stated, the work described from here on concerns transgenic line #1. To determine whether mRNA encoded by the transgene is translated to protein, SMDF (and other glycosylated proteins) from adult *NSE-hSMDF* brain and sciatic nerve homogenates were concentrated by lectin binding (Cabedo et al., 2004) and immunoblotted with an anti-neuregulin β 3-specific antibody (see Material and Methods). As shown in supplemental Figure S3 (available at www.jneurosci.org as supplemental material), SMDF immunoreactivity was noticeably increased in the nervous tissue of the *NSE-hSMDF* mice. To further define the expression pattern of the transgene we performed RT-PCR experiments with primers designed to amplify *hSMDF* but not endogenous mouse *SMDF*. As is shown in supplemental Figure S4 (available at www.jneurosci.org as supplemental material), transgene-derived mRNA is found in neural tissues (forebrain, cerebellum, spinal cord, trigeminal, and dorsal

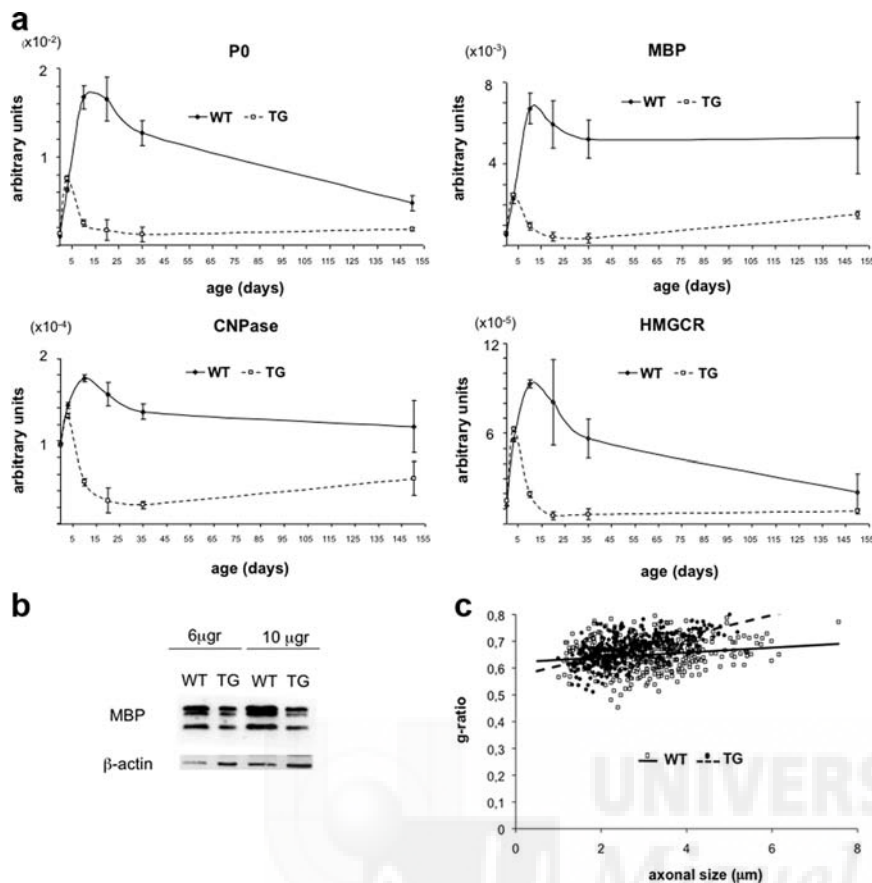


Figure 2. Overexpression of hSMDF induces a dramatic decrease in the myelin protein expression, which reflects no real myelination deficit. **a**, The mRNA for P0, MBP, CNPase, and HMGCoA reductase is dramatically downregulated in the sciatic nerves of the *NSE-hSMDF* #1^{+/-} mice. cDNA from P0, P3, P10, P20, P35, and P150 was analyzed for the expression of these genes by qPCR. mRNA levels are expressed in arbitrary units after normalization to a housekeeping gene (18S). **b**, The drop in mRNA is reflected in a decrease in the steady-state levels of myelin proteins as shown by the anti-MBP Western blot of protein extracts of P20 *NSE-hSMDF* #1^{+/-} sciatic nerves and wild-type littermates. **c**, Myelin thickness is not altered in the mutant nerves. Myelin thickness was estimated by determining the *g*-ratio in EM images obtained from mutant P20 mice and wild-type littermates (see Material and Methods). *g*-Ratio was plotted against axon size. Four animals per genotype were used. Except for a slight increase for larger axons, no significant changes in *g*-ratios could be observed. Data are given as mean \pm SE. WT, Wild type; TG, transgenic.

root ganglia) but not in non-neural tissues (heart, liver, and kidney). Using qPCR, we estimated that the expression of mRNA for SMDF in the peripheral neurons of line #1 transgenic animals is increased by almost sevenfold (6.91 ± 0.04). Although less dramatically (2.6-fold), mRNA for SMDF was also increased in neurons of the transgenic line #2.

Axonal neuregulin activates two different signaling pathways in Schwann cells: the phosphatidylinositol kinase (PI3K) pathway and the RAS–MAPK pathway (Taveggia et al., 2005). To determine whether these pathways are activated in the PNS of *NSE-hSMDF* mice, the phosphorylation state of Akt and MAPK proteins was explored. Sciatic nerve homogenates from P20 *NSE-hSMDF*^{+/-} mice and their wild-type littermates were immunoblotted with anti-phospho-Akt and anti-phospho-MAPK-specific antibodies (see Material and Methods). Figure 1c shows that the phosphorylation state of MAPK was increased in the transgenic mice, suggesting that overexpression of neuregulin in neurons produces sustained activation of the MAPK signaling pathway in Schwann cells. Akt (a downstream effector of PI3K) was also hyperphosphorylated in the transgenic mice, although less dramatically compared with MAPK (Fig. 1c). Together, these data suggest that overexpression of SMDF in neurons provokes

the sustained activation of two key signaling pathways for the proliferation and differentiation of Schwann cells.

Effect of SMDF overexpression on PNS development and myelination

We investigated the expression of myelin-related genes in the sciatic nerves during postnatal development of the *NSE-hSMDF* mice. mRNA encoding 2',3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP), the myelin lipid biosynthetic enzyme hydroxy-methylglutaryl coenzyme A (HMGCoA) reductase, and myelin structural proteins protein zero (P0) and myelin basic protein (MBP) were quantified by qPCR in total RNA from P0, P3, P10, P20, P35, and P150 *NSE-hSMDF*^{+/-} mice and wild-type littermates (see Material and Methods). Gene expression levels were normalized against 18S rRNA. As is shown in Figure 2a, each of the selected Schwann cell mRNAs was dramatically downregulated in *NSE-hSMDF* mice. The reduction in *MBP* transcripts was accompanied by a reduction of $53 \pm 1.1\%$ in MBP protein ($n = 4$), revealed by immunoblotting P20 sciatic nerve extracts (Fig. 2b). The reduction in myelin-related mRNAs was also observed, to a lesser extent, in the *NSE-hSMDF* transgenic line #2 (~7 integrated copies rather than ~24) (supplemental Fig. S5, available at www.jneurosci.org as supplemental material), suggesting that the reduction in myelin gene expression is the consequence of neuregulin overexpression and not transgene positional effects. Myelin protein expression has been widely used as a surrogate marker of myelination; however, there are situations in which myelin protein expression does not

accurately reflect the myelination state of axons (Muse et al., 2001). Therefore, we examined sciatic nerves of P20 *NSE-hSMDF*^{+/-} mice in the electron microscope and determined the *g*-ratio (axon diameter/outer diameter of myelin sheath) as an estimate of myelin thickness. Surprisingly, except a slight decrease in the thickness of myelin for larger axons, no major changes in the myelin thickness occurred (*g*-ratio, 0.67 ± 0.004 for wild type and 0.65 ± 0.013 for mutant; $n = 4$ animals per genotype) (Fig. 2c). Therefore, our data show that overexpression of SMDF in PNS neurons provokes a reduction in myelin mRNAs and proteins but no corresponding deficit in myelination.

Hyperproliferation of Schwann cells causes enlargement of peripheral nerves

The lack of any reduction in myelin thickness in *NSE-hSMDF* mice raised the possibility that the apparent reduction in myelin gene expression might be a “dilution” effect caused by hypertrophy of other endoneurial compartments of the nerve. This idea was supported by the striking enlargement of nerve roots and dorsal root ganglia in *NSE-hSMDF*^{+/-} mice (Fig. 3a). A detailed microscopic analysis showed that the space between myelinated axons was dramatically increased in the transgenic animals, espe-

cially between P14 and P35 (Fig. 3*b*). Part of this increase is apparently caused by the expansion of the extracellular matrix, mainly proteoglycans and proteins (Fig. 3*b*) (see Fig. 8*c–e*). Although this expansion might explain the reduction in specific signal on Western blots (in which the loaded sample is normalized to total protein concentration), it cannot explain the dramatic decrease in the cognate mRNAs. The reduction of myelin-related mRNAs might, however, be explained by an increase in the number of nonmyelinating cells, for example, fibroblasts or nonmyelinating Schwann cells. To test this, we estimated by immunoblot the amount of ErbB3, a receptor that is expressed in both myelinating and nonmyelinating Schwann cells but not in fibroblasts (Jessen and Mirsky, 2005). Protein extracts from sciatic nerves of P20 *NSE-hSMDF*^{+/−} mice and wild-type littermates were analyzed on Western blots with a polyclonal anti-ErbB3 antibody. ErbB3 protein was upregulated in *NSE-hSMDF*^{+/−} mice (Fig. 4*a*), suggesting that the Schwann cell population is expanded. This expansion seemed to involve preferentially nmSC, because GFAP, a reliable marker for nmSC (Jessen and Mirsky, 2005), was dramatically upregulated. Also supporting this interpretation, immunoreactivity for ApoE, which is expressed mainly in nmSC in the PNS (Boyles et al., 1985), was also greatly increased (Fig. 4*a*). Immunofluorescence microscopy confirmed that GFAP-positive (GFAP⁺) nmSC are much more numerous in *NSE-hSMDF*^{+/−} mice (Fig. 4*b*). The sciatic nerves of wild-type mice were mainly occupied by myelinating Schwann cells (S100β⁺, GFAP-negative, elongated nuclei), whereas in *NSE-hSMDF*^{+/−} mice there were large clusters of nmSC separating the axons (GFAP⁺, irregular shaped nuclei) (Fig. 4*b*). Toluidine blue staining of cross-sectioned nerves revealed that myelinated axons were less densely packed in *NSE-hSMDF* nerves compared with wild type, because the former contained abnormally large numbers of nonmyelinating cells in the inter-axonal space (Fig. 4*c*). However, no changes in the number of myelinating Schwann cells (Krox-20⁺) per unit of nerve length could be observed (wild type, 100 ± 19%; transgenic, 108 ± 16%; *n* = 3) (Fig. 4*d*). Together, our data show that the enlargement of the nerves in the transgenic animals results from a large increase in the numbers of nmSC. To quantify the increase in cellularity and nerve thickness during postnatal development, cross-sections of sciatic nerves from *NSE-hSMDF*^{+/−} mice and wild-type littermates were stained with bisbenzimidazole (Hoechst nuclear stain) (Fig. 4*e*). Cross-sectional area and number of nuclei per cross-section were counted in confocal microscope images (Fig. 4*f,g*). As is shown in Figure 4*f*, the cross-sectional area of P5 transgenic sciatic nerves and wild-type littermates was essentially the same (wild type, 62.8 ± 3.5 μm², *n* = 5 animals; transgenic, 64.3 ± 1.0 μm², *n* = 5). At P20, the area of sciatic nerves in wild-type animals had increased ~1.9-fold compared with P5 (116.2 ± 6.8 μm², *n* = 5), whereas it had increased ~3.4-fold in the transgenic animals (221.1 ± 11.7 μm², *n* = 5). At P150, cross-sectional area was still larger in the transgenic mice relative to wild type (297.2 ± 1.4 μm², *n* = 5 vs 260.8 ± 1.7 μm², *n* = 5, respectively). The number of nuclei per section (Fig. 4*g*) was also very similar at P5 in wild-type and transgenic animals (458 ± 26 nuclei per section in wild

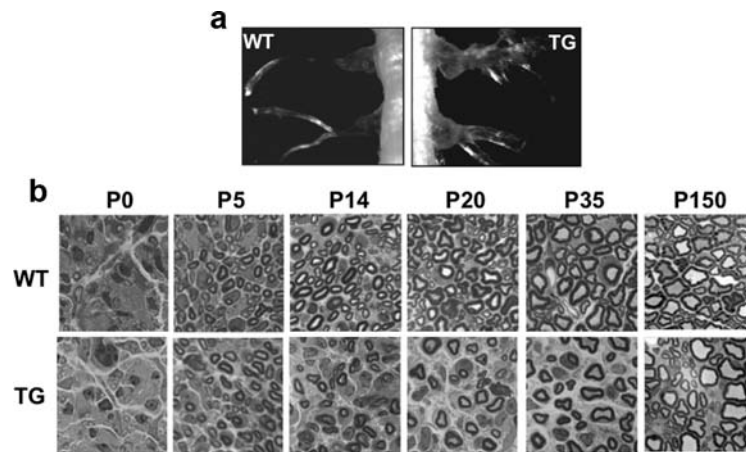
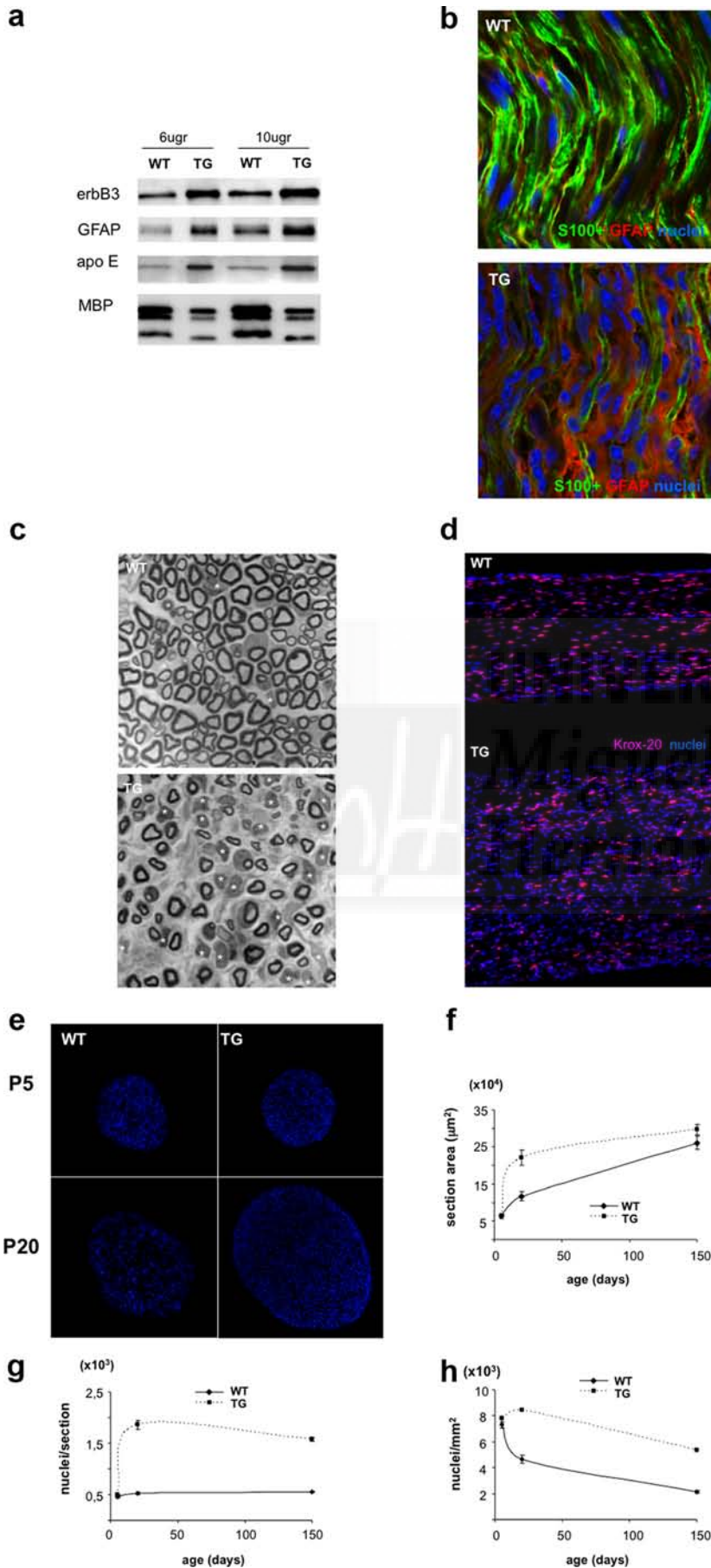


Figure 3. Transgene expression enlarges peripheral nerves. *a*, Nerve roots and ganglia of P20 mutant *NSE-hSMDF*^{#1+/−} mice [transgenic (TG)] are notably enlarged when compared with wild-type littermates (WT). *b*, Mutant nerves (TG) show evident morphological alterations during postnatal myelination. Initial steps of myelination (P0–P5) are indistinguishable in the *NSE-hSMDF* mutants and wild-type littermates. In contrast, from P14 to P150, the number of myelinated axons per section is notably decreased in the mutant sciatic nerves. Images (60×) of toluidine blue-stained sciatic nerves cross-sections were obtained from mice of the indicated ages.

type, *n* = 5; 499 ± 6 nuclei per section in transgenics, *n* = 5). However, by P20, the number of nuclei per section was much greater in *NSE-hSMDF*^{+/−} mice compared with wild type (1859 ± 89, *n* = 5 vs 527 ± 26, *n* = 5). At P150, the number of nuclei per section was still higher in the transgenic animals (1580 ± 30, *n* = 5 vs 550 ± 20, *n* = 5). Interestingly, the number of nuclei per unit area drops between P5 and P20 in wild-type nerves, probably as a consequence of increasing myelination and the consequent increase in Schwann cell volume (Fig. 4*h*). In contrast, in transgenic mice the density of nuclei does not fall between P5 and P20. After P20 (when myelination is complete), the number of nuclei per unit volume declines at a similar rate in both transgenic and wild-type nerves (Fig. 4*h*). Similar results (although less marked) were found in the independent transgenic line #2 (supplemental Fig. S6, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Apart from Schwann cell numbers, an increase in the number and/or volume of axons could also theoretically contribute to the enlargement of nerves in mutant mice. To explore this possibility, we estimated axon density at P5, P20, and P150 in *NSE-hSMDF*^{+/−} mice and their wild-type littermates. The density of myelinated axons was practically the same in transgenic and wild-type animals at P5 (Fig. 5*a*). However, at P20, the density of myelinated axons in transgenic nerves dropped to 60.9 ± 7.6% that of wild type. However, allowing for the increase in nerve cross-sectional area (~1.9-fold), the number of axons per nerve is very similar in transgenic and wild-type animals (115 ± 14% in transgenics relative to wild type). To explore the potential contribution of an increase in axonal volume to the increased nerve volume, we measured axon perimeter in P20 *NSE-hSMDF*^{+/−} and wild-type nerves. As is shown in Figure 5*b*, the distribution of axon perimeters in transgenic animals was clearly shifted toward smaller sizes compared with their wild-type littermates (Fig. 5*b*). Together, our data demonstrate that axons do not contribute to the increased thickness of peripheral nerves in *NSE-hSMDF* animals.

The augmented number of Schwann cells in *NSE-hSMDF* animals might be caused by increased proliferation and/or by a decrease in apoptosis in the P5–P20 period. Because apoptosis is already low in late postnatal nerves (Grinspan et al., 1996), we



focused in putative changes in cell proliferation. BrdU (50 mg/kg body mass) was administered to *NSE-hSMDF^{+/−}* mice aged P5 or P14 (see Material and Methods). After three injections, the mice were killed, and sciatic nerve cells were dissociated and plated on poly-L-lysine- and laminin-coated coverslips. After cell attachment (~12 h), cells were fixed and immunolabeled with anti-S100 β and anti-BrdU antibodies. The BrdU labeling index (fraction of S100 β ⁺ Schwann cells that was BrdU⁺) is plotted in Figure 5*d*. At P5, the labeling index was substantially greater in the transgenic mice than in their wild-type littermates, indicating an increased proliferation rate in the transgenics. In contrast, at P14, the proliferation rates of transgenic and wild-type Schwann cells had converged. In the same line, the number of phospho-Histone H3-positive nuclei (a maker of mitosis) was found also increased in the P5 transgenic nerves (Fig.

Figure 4. Nerve enlargement is caused by the hyperplasia of the nmSC during the postnatal development. **a**, The amount of erbB3 protein (a Schwann cell marker) was notably increased, suggesting that there are more Schwann cells in the mutant nerves. GFAP (a protein expressed exclusively in nmSC) is also clearly upregulated, suggesting that the expanded population of Schwann cells is mainly in a nonmyelinating state. In support of this tenet, the expression of ApoE was also increased. In contrast, MBP expression was notably downregulated in the mutant nerves. Protein extracts from *NSE-hSMDF#1^{+/−}* and wild-type nerves were submitted to SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibody. **b**, Immunohistochemistry of mutant nerves: nmSC (GFAP⁺) were barely observed in longitudinal sections of wild-type P20 sciatic nerves under the confocal microscope. In contrast, big clusters of nmSC segregate myelinated fibers (S100⁺ with sharp nucleus) in the nerves of mutant animals. **c**, Detailed inspection of toluidine blue-stained sections show that the number of cells dissociated from axons is increased in the mutant nerves (asterisks). **d**, The number of myelinating cells is not increased in the mutant nerves. Although the density of Krox-20⁺ nuclei is notably decreased in mutant nerves, the number of Krox-20⁺ nuclei per unit of nerve length is similar in wild-type and transgenic nerves. **e**, Transgene expression increases dramatically the number of nucleated cells in the P20 mutant nerves. Images obtained with a confocal microscope from sciatic nerve sections stained with bisbenzimide of *NSE-hSMDF#1^{+/−}* mice [transgenic (TG)] and wild-type littermates (WT). **f**, Sciatic nerve section area in wild-type and mutant mice during postnatal development. The nerve section was estimated for at least five animals with the indicated age. **g**, The number of cells (nuclei) is dramatically increased in the mutant mice. Nuclei were counted from cross-sections stained with bisbenzimide using NIH ImageJ software. The number of nuclei per section was estimated for at least five animals of the indicated age. **h**, In contrast to wild types, mutants do not show the postnatal decrease in nuclei density that occurs during myelination. From P20 to P150, the drop in nuclei density (slope) is very similar in mutants and wild-type littermates, suggesting that the main alterations of mutant nerves are produced during the postnatal development. Data are given as mean \pm SE.

5e,f). Therefore, the hypercellularity of transgenic nerves is caused mainly by the hyperproliferation of Schwann cells between P5 and P14.

In summary, our data suggest that the enlargement of sciatic nerves in the *NSE-hSMDF* mice is the consequence of the *in vivo* mitogenic effect of type III- β 3 neuregulin (SMDF) on nonmyelinating Schwann cells.

Remak bundle degeneration and myelination

It has been shown that small-sized axon segregation in the Remak bundles is controlled by type III neuregulins (Taveggia et al., 2005). To investigate whether the type III- β 3 neuregulin isoform also plays a role in small-caliber axon ensheathment and segregation, we obtained electron microscope images of sciatic nerves from P20 *NSE-hSMDF*^{+/-} mice and wild-type littermates. As is shown in Figure 6, the structure of the Remak bundles in the mutant nerves is dramatically altered. In contrast to wild type (Fig. 6*a,b*), most of the small-caliber axons of the transgenic mice remain unsegregated within the Schwann cell cytoplasm, forming a single fascicle of axons located in a large pocket (Fig. 6*c,d*). However, the number of axons per Remak bundle remains unaltered. A detailed quantification of the number of axons per pocket and total axons per bundle in mutant and wild-type nerves is shown in Figure 6, *e* and *f*.

Interestingly, in mutant bundles, the nmSC is apparently “extruded” from the fascicle and ensheathes the whole pack of axons as if it were a single large-caliber axon, in what resembles a premyelinating complex. Strikingly, a significant number of these atypical Remak bundles (~20%) develop an electron-dense structure surrounding the axon fascicle resembling a compact myelin sheath (Fig. 6*g-j*). Indeed, the high-resolution structure of this electron-dense material in the electron microscope was indistinguishable from compact myelin around single axons (Fig. 6*k,l*). In longitudinal sections, myelination seems to be continuous along some axon bundles (Fig. 6*m*), whereas in others myelination is only partial (Fig. 6*n*). To our surprise, no “normal” Remak bundles could be found in P20 transgenic nerves (supplemental Fig. S7, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Although much less dramatically, Remak bundle degeneration and myelination was also observed in transgenic line #2 (data not shown). Together, our data suggest that the expression of type III- β 3 neuregulin in small-caliber axons, in addition to stimulating Schwann cell proliferation, reprograms the nmSC into a myelinating phenotype and results in the myelination of whole Remak bundles as single units.

Unmyelinated small-diameter axons in normal Remak bundles have slow conduction velocities (<1 m/s) and can be iden-

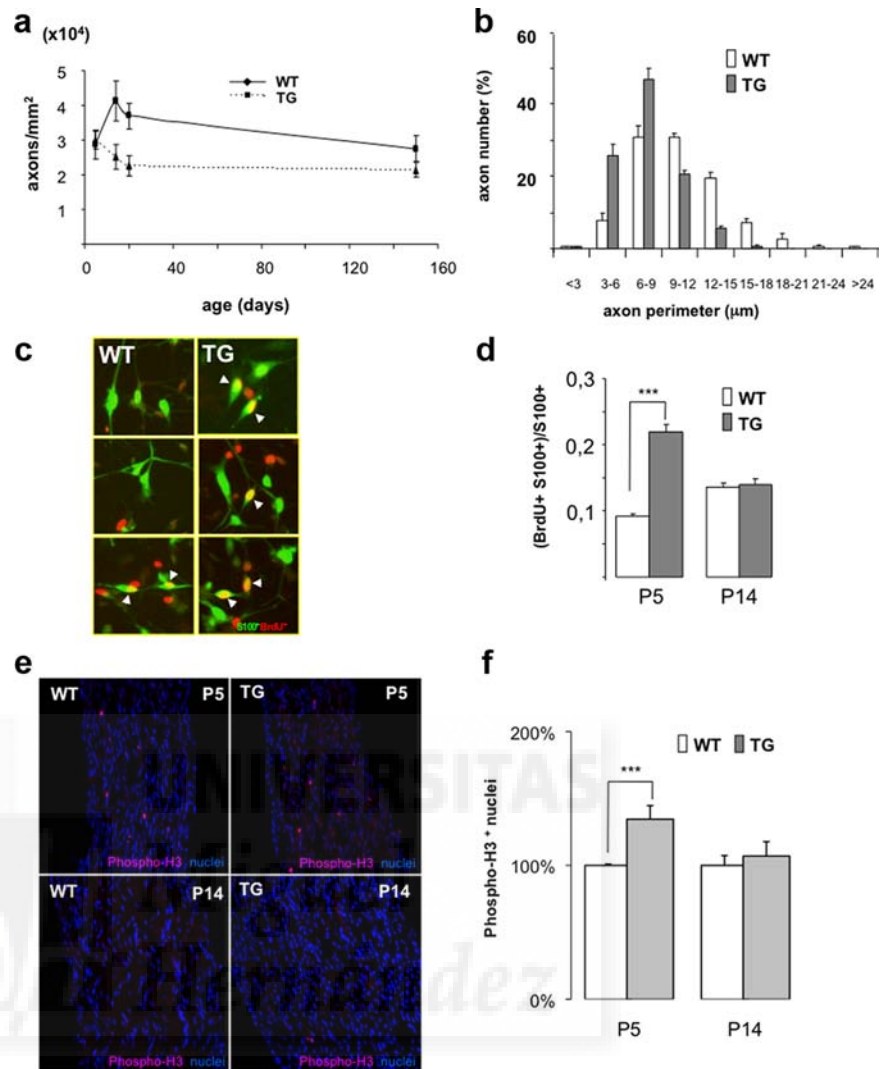


Figure 5. Increased Schwann proliferation rate but not axon size or density drives to nerve enlargement. *a*, Axonal density is lower in the mutant mice, suggesting that an increase in the number of axons does not contribute to nerve enlargement. *b*, The distribution of axon perimeter is shifted to the left in the P20 mutant mice, ruling out that axon swelling could contribute to nerve enlargement. Axon density and size were estimated in optical and EM images obtained from sections of two or more sciatic nerves from mice of the indicated age. *c, d*, BrdU experiments show increased proliferation of Schwann cells in mutant mice. Number of BrdU-labeled cells in sciatic nerves of P5 and P14 *NSE-hSMDF*^{+/-} mice and wild-type littermates were counted and normalized to S100⁺ Schwann cells (see Materials and Methods). A notable increase in the Schwann cell proliferation in the mutants could be observed at P5 but not at P14. *e, f*, Similar results were obtained when the mitotic index (phospho-Histone H3⁺) was estimated. Two to three animals per genotype and age were used. Data are given as mean \pm SE (***) $p < 0.0001$, Student's *t* test.). WT, Wild type; TG, transgenic.

tified as “C-fibers” in recordings of compound action potentials along sciatic nerves. C-fibers have been shown to be involved in temperature sensing, pain, mechanical transduction, and itching. The proper ensheathment and segregation of small axons in individual pockets of the nmSC cytoplasm is critical for nerve function (Taveggia et al., 2005). To explore whether the atypical myelination and aberrant segregation of small-caliber axons in the abnormal Remak bundles of *NSE-hSMDF* mice affects nerve conduction velocity, sciatic nerves from adult *NSE-hSMDF*^{+/-} mice and wild-type littermates were removed, and compound action potentials were recorded (see Materials and Methods). We found that myelination of Remak bundles did not increase the nerve conduction velocity in the C-fibers. In fact, a significant decrease in the conduction velocity was found (Fig. 7*a,b*). Surprisingly, and although myelination of individual large-diameter

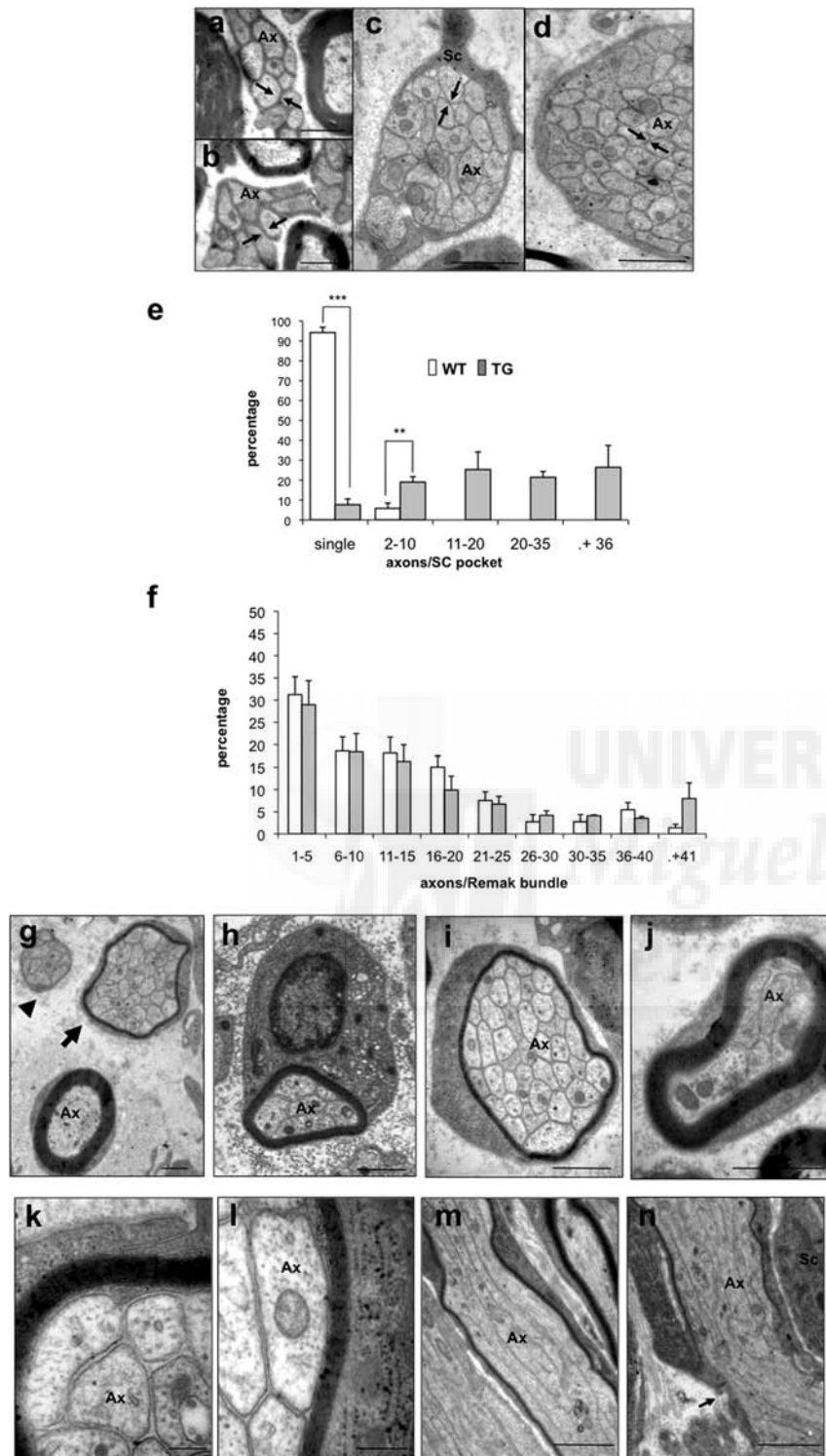


Figure 6. Transgene expression disrupts small-diameter axon segregation and induces Remak bundle myelination. *a, b*, Transmission EM images obtained from P20 wild-type mice showing that small-sized axons (Ax) are segregated by the cytoplasm of the nmSC in the Remak bundle (arrows). Scale bars, 1 μm . *c, d*, No cytoplasm segregates small-sized axons in the *NSE-hSMDF* mice (arrows). In these nerves, the Schwann cell (Sc) remains outside of the bundle ensheathing the whole pack of axons. Scale bars, 1 μm . *e*, Distribution of axons per pocket is profoundly modified in mutant nerves. In contrast to wild type, in mutant nerves, very few axons are found in individual pockets. *f*, In contrast, the number axons per Remak bundle is not changed. More than 170 bundles from four P20 different animals ($n = 4$) were counted per genotype. Data are given as mean \pm SE (** $p = 0.0041$, *** $p < 0.0001$, Student's *t* test.). *g*, With these atypical Remak bundles (arrowhead), others coexist in which the ensheathing Schwann cell has developed a myelin membrane wrapping the whole bundle (arrow). The total area of the myelinated bundle is similar to the area of myelinated axons. Scale bar, 1 μm . *h-j*, Myelinated bundles with increased magnification. Scale bars, 1 μm . *k, l*, High-power EM images of mutant Remak bundles. The membrane wrapping the bundle is structurally indistinguishable of a myelin sheath. Scale bars, 0.2 μm . *m, n*, EM images of longitudinal sections of mutant nerves showing that, whereas some bundles seem completely myelinated (*m*), myelination is not always continuous along other bundles (*n*, arrow). Scale bars, 1 μm . WT, Wild type; TG, transgenic.

axons is basically normal (Fig. 2*c*), nerve conduction velocity of myelinated single fibers was also decreased in the transgenic mice (Fig. 7*c,d*).

Sustained neuregulin axon–glial signaling induces the development of neurofibroma-like lesions and peripheral nerve sheath tumors

Type I neurofibromatosis is a genetic disease caused by the inactivation of the *Nfl* gene (Cichowski and Jacks, 2001; Zhu et al., 2002). Neurofibromas are benign tumors that enlarge nerves (Zhu et al., 2002; Ling et al., 2005). Histology of neurofibroma is characterized by Schwann cell hyperplasia, dissociation of Schwann cells from axons, increased endoneurial collagen matrix, and mast cell accumulation (Ling et al., 2005). As has been introduced previously, *NSE-hSMDF*^{+/-} transgenic nerves displayed several traits of neurofibroma. First, at early postnatal ages (P20), all transgenic mice show an obvious enlargement of nerve roots (Fig. 3*a*), resembling plexiform neurofibromas (Zhu et al., 2002). Enlargement was also observed in the dorsal root ganglia, trigeminal ganglia, and sciatic and brachial nerves (data not shown). Moreover, the number of Schwann cells (mainly dissociated and nonmyelinating Schwann cells) in transgenic nerves was also noticeably increased (Fig. 4*d,f*). To investigate further the neurofibroma-like phenotype of *NSE-hSMDF*^{+/-} mice, we asked whether the endoneurial collagen matrix of mutant sciatic nerves was increased, as in neurofibroma. We stained sections of sciatic nerves with Gomori's trichrome stain, a histological reagent that renders extracellular collagen green and cell cytoplasm purple. In wild-type mice, collagen (green) was primarily restricted to the perineum, being very faint in the endoneurium (Fig. 8*a*). In contrast, the transgenic nerve showed a rich green staining of the endoneurium (Fig. 8*b*), suggesting an increase in collagen deposition. In electron microscope images, the myelinated axons of the transgenic nerves were also separated by abnormally expanded extracellular matrix highly enriched in collagen fibrils (Fig. 8*c–e*, arrows).

Five to 10% of patients with plexiform neurofibroma develop malignant peripheral nerve sheath tumors, an aggressive type of cancer that decreases enormously life expectancy and quality. To know whether the overactivation of the neuregulin pathway promotes as well the apparition of peripheral nerve tumors, we aged *NSE-hSMDF*^{+/-} transgenic mice

and littermates. Approximately 1 in 10 *NSE-hSMDF^{+/-}* mice develop big tumors in the peripheral nervous system producing neurological symptoms (Fig. 9a). Tumors could be identified in both transgenic lines, mainly between 6 and 24 months of age. In mouse line #1, 12.4% of transgenic animals (11 of 89) showed symptomatic big peripheral nerve tumors, whereas no tumors were detected in wild-type littermates of the same age (0 of 78). In mouse line #2, 10.5% transgenic mice showed peripheral nerve tumors (4 of 38), whereas no tumors were found in its wild-type littermates (0 of 29). In most cases, the tumors were clearly associated with peripheral nerves and/or ganglia (Fig. 9b–e). Immunohistochemistry studies showed that tumors express S100 β and GFAP (Fig. 9f), suggesting a Schwann cell origin. Supporting this view, mRNA for P0, MBP, and CNPase could also be detected (data not shown). Together, our data show that the sustained axon–glial signaling at the Remak bundle produces neurofibroma-like lesions that in some cases are transformed into peripheral nerve sheath tumors.

Discussion

Members of the neuregulin family are abundantly expressed in the nervous system in which they are involved in pivotal steps of neuron and glial cell biology and development (Meyer et al., 1997; Jessen and Mirsky, 2002; Nave and Schwab, 2005). The Neuregulin 1 gene encodes for at least 15 different isoforms, grouped in three different types. Type III isoforms (but no type I or II) have been shown to regulate the myelination of PNS neurons (Nave and Salzer, 2006). There are at least two different type III neuregulins. The first type III isoform reported was the type III- β 3, also known as SMDF. This neuregulin is highly expressed in the sensory and motor neurons of the dorsal root ganglia (Ho et al., 1995) and segregated into lipid rafts, membrane platforms pivotal for axon–glial signaling (Cabedo et al., 2002, 2004; Decker and ffrench-Constant, 2004).

It was shown recently that type III neuregulins regulate the thickness of the myelin sheath (Michailov et al., 2004). In addition, the artificial expression of one of these isoforms (the III- β 1a isoform) in unmyelinated axons converts them to a myelinated phenotype, suggesting that threshold levels of neuregulin determines the myelination status of the axon (Taveggia et al., 2005). Here we show that, in contrast to type III- β 1a, *in vivo* overex-

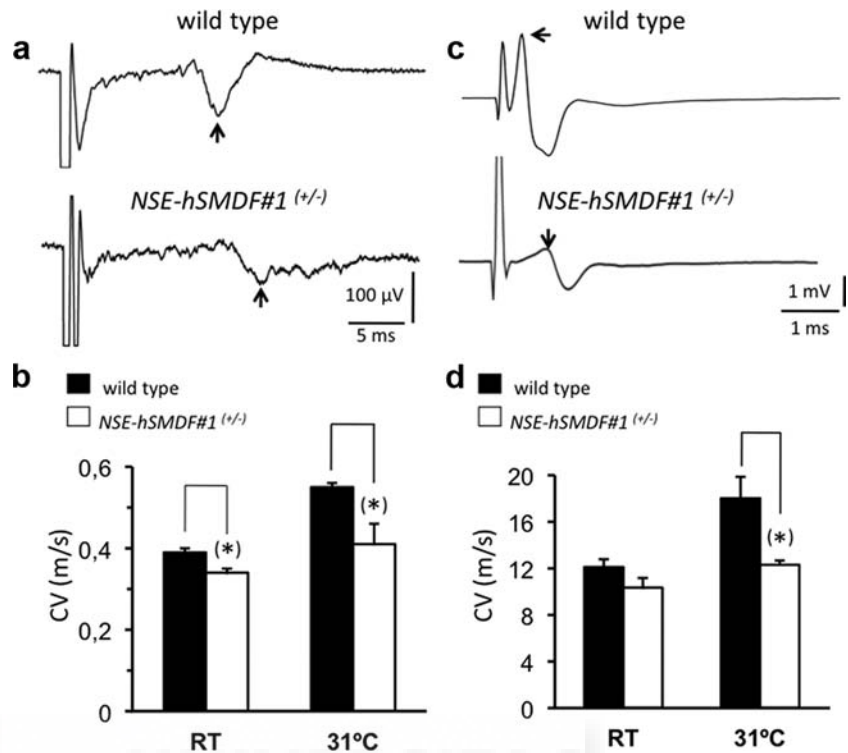


Figure 7. Nerve conduction velocity of C-fibers is decreased in the mutant mice. *a*, Typical recording of compound action potential from the sciatic nerves of *NSE-hSMDF#1^{+/-}* and wild-type littermates. Arrows indicate signal from C-fibers. *b*, Quantification at room temperature (RT) and 31°C shows that C-fiber conduction velocity (CV) is decreased in the mutant mice. *c*, *d*, Conduction velocity of myelinated fibers (arrows) is also reduced, probably as a consequence of the reduced diameter of axons in the transgenic animals. *n* = 4 animals for RT and *n* = 2 for 31°C recordings. Data are given as mean \pm SE (**p* < 0.05, Student's *t* test).

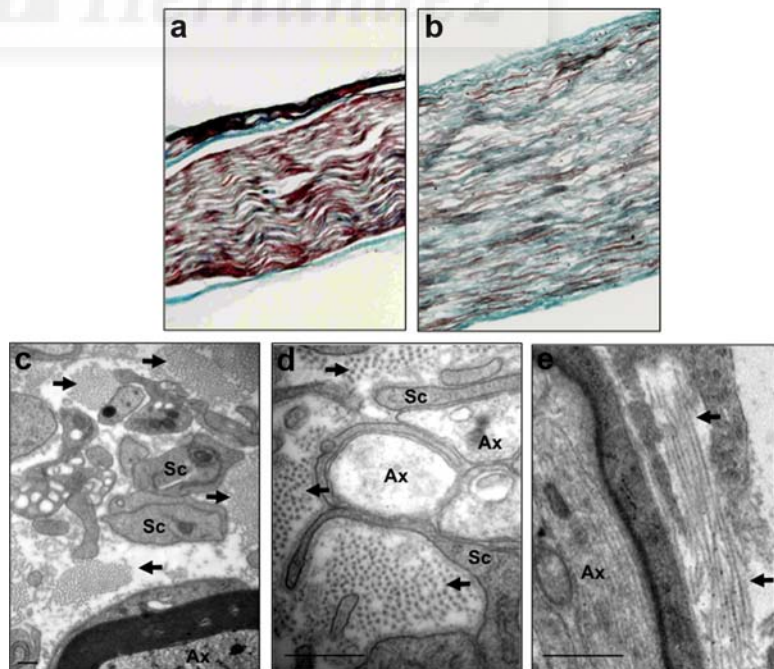


Figure 8. Accumulation of extracellular collagen in the mutant nerves. *a*, Gomori's trichrome staining of wild-type nerves shows that collagen (green) is concentrated in the perineurium and barely detectable in the endoneurium, which is mainly occupied by cytoplasm (purple). *b*, In contrast, endoneurium of mutant nerves is widely stained in green, suggesting that collagen accumulates in the extracellular matrix. *c*, *d*, High-power EM images obtained from cross-sections of mutant animals showing large deposits of collagen fibrils in the extracellular space. *e*, Collagen fibrils can be also observed in longitudinal sections of mutant nerves. Ax, Axons; Sc, Schwann cells. Scale bars, 0.5 μ m.

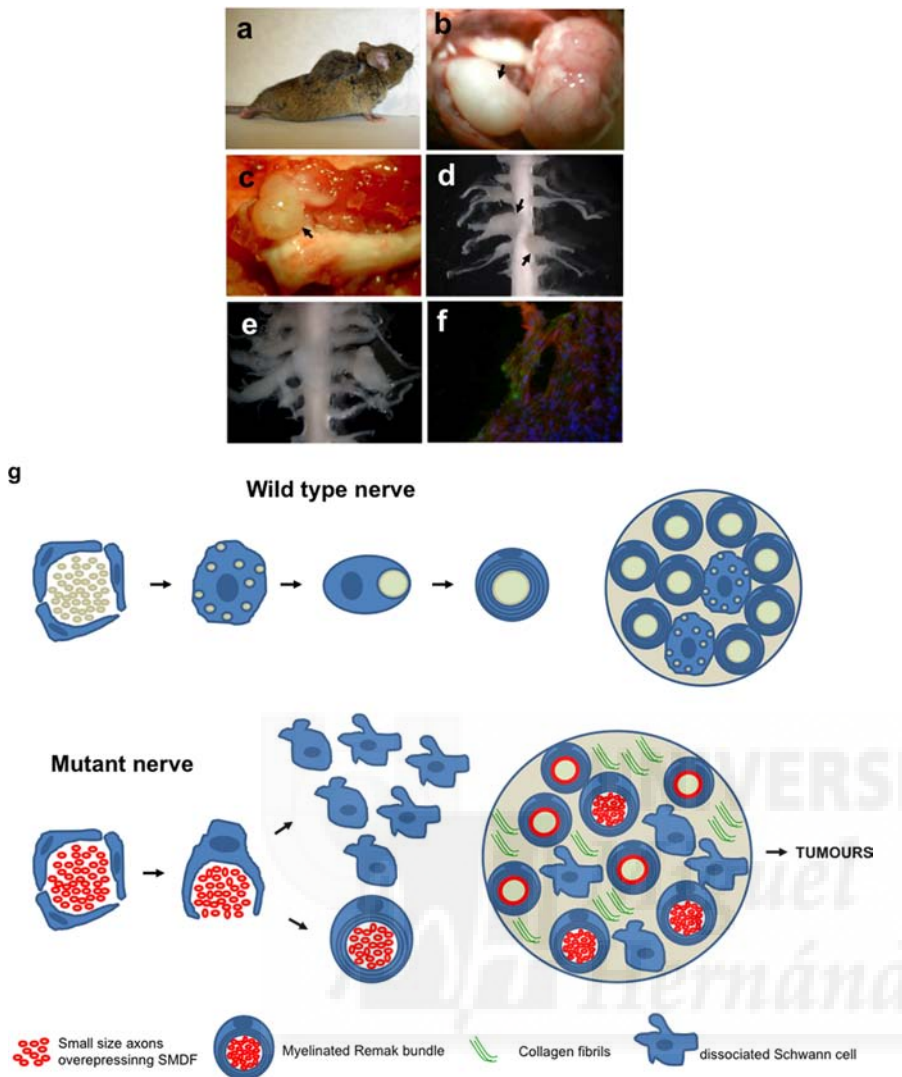


Figure 9. Sustained neuregulin signaling induces tumorigenesis. *a*, Tumors produce neurological symptoms, such as limb paralysis and postural alterations. *b*, A big tumor in the trigeminal ganglia in an *NSE-hSMDF* mutant mouse. *c*, One of the tumors originated in a cervical nerve root of the spinal cord. *d*, Tumors originated in the nerve roots and dorsal ganglia compressing the spinal cord in transgenic animals. *e*, Multiple enlargement of nerves and ganglia at the cervical and dorsal level of the spine. *f*, Immunohistochemistry showing that tumors express S100 β (red) and GFAP (green). Nuclei were stained with bisbenzimidazole (blue). *g*, Model for the development of nerves in wild-type and mutant mice. Top, During the postnatal development of wild-type nerves, Schwann cells ensheath and myelinate large-diameter axons. Small-sized axons remain ensheathed but unmyelinated in the Remak bundles (adapted from Jessen and Mirsky, 2005). Bottom, Overexpression of SMDF (red) has a mitogenic effect on Schwann cells inducing hyperproliferation. SMDF also induces a phenotypic change of the nmSC toward a myelinating phenotype, which results in the myelination of the bundles.

pression of type III- β 3 isoform (SMDF) does not increase myelin thickness in the PNS. Although these studies were performed using different promoter constructs (NSE and Thy1), given their broad neuronal expression in many neurons (Morris et al., 1983; Kollias et al., 1987; Forss-Petter et al., 1990; Vega et al., 1990) and their similar postnatal expression pattern (supplemental Fig. S9, available at www.jneurosci.org as supplemental material), these are probably bone fide differences in neuregulin isoform activity. We do not have a molecular explanation for the dissimilar behaviors of the III- β 1a and III- β 3 isoforms. However, it might be significant that the type III- β 3 isoform lacks the transmembrane and cytoplasmic domains located at the C terminus of type III- β 1a. It has been suggested that this domain might signal back to the cell nucleus (Bao et al., 2003); thus, the possibility exists that the increase in myelin thickness induced by type III- β 1a could

require the coexpression of an additional (yet unidentified) growth factor induced by back-signaling.

Although it is well known that neuregulins are mitogenic factors for Schwann cells *in vitro* (Stewart et al., 1991; Dong et al., 1995; Levi et al., 1995; Maurel and Salzer, 2000), there has been no conclusive *in vivo* evidence (Jessen and Mirsky, 2005). By using BrdU uptake experiments and phospho-Histone 3 immunohistochemistry, we have shown that nerve enlargement in NSE-SMDF mice is caused by early postnatal hyperproliferation of nmSC, supporting that SMDF is a mitogenic factor for Schwann cells *in vivo*. The increased proliferation in the transgenic nerves is transient, not persisting after P14. The reason for this is not clear because expression of the SMDF transgene continues after P14 and even during adulthood (data not shown). One possibility is that stability of SMDF, ErbB2, or ErbB3 proteins might decrease after P14. However, this seems unlikely because PI3K and MAPK pathways remain hyperactivated in P20 transgenic nerves. Another possibility is that Schwann cell proliferation is self-limited, through a balance between the relative rates of supply and demand of SMDF and other mitogens: as Schwann cell number increases, so might their rate of consumption/degradation of SMDF. There is evidence that such a mechanism involving PDGF regulates oligodendrocyte precursor proliferation and ultimate cell number in the developing CNS (Calver et al., 1998; van Heyningen et al., 2001). Other explanations are, however, also possible.

It is well established that myelination depends on axon diameter (Friede and Bischhausen, 1982). Small-caliber axons ($<1 \mu\text{m}$) are not large enough to be myelinated and remain grouped in packs and ensheathed by the nmSC in Remak bundles. It has been suggested that neuregulins contribute to the correct segregation of small-diameter axons in the Remak bundle (Taveggia et al., 2005). Here we show that overexpression of type III- β 3 neuregulin in neurons has dramatic effects on the organization of Remak bundles. The small-caliber axons are not segregated in individual pockets in the nmSC cytoplasm as they normally are but are compacted into a tight fascicle that is ensheathed by compact myelin, as if it were a single large-diameter axon. The conduction velocity of abnormally myelinated Remak bundles is not increased; on the contrary, we found that their conduction velocity was decreased relative to normal C-fibers. This is presumably related to the fact that only the peripheral axons of the bundle are in contact with the myelin membrane, the majority in the interior of the bundle remaining unmyelinated. Even for those axons that are in contact with myelin, contact is only partial. Furthermore, myelination is not continuous along the longitudinal axis of the

bundles, leaving large parts of the axons unmyelinated (although ensheathed by a single nmSC wrap) (Fig. 6*n*). This by itself would be expected to severely hamper saltatory conduction.

It has been shown previously that adequate segregation of C-fibers in individual cytoplasmic pockets is pivotal for proper conduction (Taveggia et al., 2005). Because the axons in the aberrant bundles are not individually segregated but close to or in contact with one another, this also would be expected to interfere with conduction. Interestingly, the conduction velocity of myelinated individual fibers was also decreased in the mutant nerves (Fig. 7*c,d*). Because there is not an obvious change in the myelin thickness, we believe that this is probably provoked by a downward shift in the distribution of axon caliber size (Fig. 5*b*). In support of this view, we also found a significant decrease in the current amplitude for the component of myelinated fibers (supplemental Fig. S8, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

During our study, we observed that *NSE-hSMDF*^{+/-} mice develop several phenotypic traits of neurofibromatosis. One of the most remarkable observations was that they develop enlarged nerve roots and peripheral ganglia (Fig. 3*a*) with a striking similarity to human plexiform neurofibromas and animal models of the disease (Cichowski et al., 1999; Zhu et al., 2002). A detailed microscopic study shows that nerve enlargement is mainly caused by the hyperplasia of nmSC. Interestingly, it has been suggested that the induction of abnormal proliferation of nmSC triggers neurofibroma formation. In *Nf1*^{fllox/-}; *POA-cre*⁺ mice, Zheng et al. (2008) have shown that *Nf1* deficiency does not cause hyperproliferation or tumorigenesis during the early postnatal period. The only differential trait found at this time is the existence of abnormal Remak bundles. Akin to *NSE-hSMDF* mice, Remak bundles in these animals contain poorly segregated axons and, in some cases, myelinated structures containing both small- and large-diameter axons. These authors suggest that neurofibromas that originate at later stages in *Nf1*^{fllox/-}; *POA-cre*⁺ mice are caused by the hyperproliferation of nmSC in the postnatal nerves. Our own data show that sustained overexpression of SMDF also induces nmSC hyperproliferation and disorganization of Remak bundles. As in the case of type I neurofibromatosis, Remak bundle degeneration also facilitates the development of big peripheral nerve sheath tumors. Whether there is link between both pathological mechanisms needs to be further explored.

The NRG1-erbB pathway is hyperactivated in many epithelial tumors (Alroy and Yarden, 2000). Interestingly, the ectopic expression of the type II neuregulin GGFβ3 in myelinating Schwann cells (*P0-GGFβ3* mice) induced as well the development of hypertrophic neuropathies and malignant peripheral nerve sheath tumors (Huijbregts et al., 2003). In the same line, the overexpression of ErbB1 receptor in Schwann cells (*CNP-epidermal growth factor receptor* mice) provokes peripheral nerve tumors (Ling et al., 2005). Moreover, the gene encoding for one of the neuregulin receptors (*ErbB2* gene) is frequently amplified in human malignant peripheral nerve sheath tumors, a cancer type derived from plexiform neurofibroma (Storzazzi et al., 2006). Although the molecular link between ErbB receptor activation and neurofibroma development needs to be further clarified, it is interesting to point out that neuregulin binding to ErbB receptors elicits the activation of the MAPK pathway, which is believed to be responsible for hyperproliferation in the *Nf1*-deficient Schwann cells (Cichowski and Jacks, 2001).

In summary, our data support the view that the sustained activation of nmSC by axon-derived neuregulin in Remak bundles can contribute to peripheral nerve tumorigenesis (Fig. 9*g*)

and points toward the inhibition of the axon–glial signaling pathway as a putative therapeutic target for the treatment of peripheral nervous system tumors.

References

- Alroy I, Yarden Y (2000) Biochemistry of HER2 oncogenesis in breast cancer. *Breast Dis* 11:31–48.
- Bao J, Wolpowitz D, Role LW, Talmage DA (2003) Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* 161:1133–1141.
- Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM (1985) Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 76:1501–1513.
- Cabedo H, Luna C, Fernandez AM, Gallar J, Ferrer-Montiel A (2002) Molecular determinants of the sensory and motor neuron-derived factor insertion into plasma membrane. *J Biol Chem* 277:19905–19912.
- Cabedo H, Carteron C, Ferrer-Montiel A (2004) Oligomerization of the sensory and motor neuron-derived factor prevents protein O-glycosylation. *J Biol Chem* 279:33623–33629.
- Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (1998) Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 20:869–882.
- Cichowski K, Jacks T (2001) NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 104:593–604.
- Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T (1999) Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science* 286:2172–2176.
- Decker L, French-Constant C (2004) Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. *J Neurosci* 24:3816–3825.
- Dong Z, Brennan A, Liu N, Yarden Y, Lefkowitz G, Mirsky R, Jessen KR (1995) Neu differentiation factor is a neuron–glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15:585–596.
- Falls DL (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284:14–30.
- Forss-Petter S, Danielson PE, Catsicas S, Battenberg E, Price J, Nerenberg M, Sutcliffe JG (1990) Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron* 5:187–197.
- Friede RL, Bischhausen R (1982) How are sheath dimensions affected by axon caliber and internode length? *Brain Res* 235:335–350.
- Fruttiger M, Calver AR, Krüger WH, Mudhar HS, Michalovich D, Takakura N, Nishikawa S, Richardson WD (1996) PDGF mediates a neuron–astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* 17:1117–1131.
- Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Boström H, Willetts K, Bertold CH, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (1999) Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 126:457–467.
- Grinspan JB, Marchionni MA, Reeves M, Coulaloglou M, Scherer SS (1996) Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci* 16:6107–6118.
- Haurogne K, Bach JM, Lieubeau B (2007) Easy and rapid method of zygosity determination in transgenic mice by SYBR Green real-time quantitative PCR with a simple data analysis. *Transgenic Res* 16:127–131.
- Ho WH, Armanini MP, Nuijens A, Phillips HS, Osheroff PL (1995) Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *J Biol Chem* 270:14523–14532.
- Huijbregts RP, Roth KA, Schmidt RE, Carroll SL (2003) Hypertrophic neuropathies and malignant peripheral nerve sheath tumors in transgenic mice overexpressing glial growth factor β3 in myelinating Schwann cells. *J Neurosci* 23:7269–7280.
- Jessen KR, Mirsky R (2002) Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat* 200:367–376.
- Jessen KR, Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6:671–682.
- Kollias G, Spanopoulou E, Grosveld F, Ritter M, Beech J, Morris R (1987) Differential regulation of a Thy-1 gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1492–1496.
- Le N, Nagarajan R, Wang JY, Svaren J, LaPash C, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J (2005) Nab proteins are essential for peripheral nervous system myelination. *Nat Neurosci* 8:932–940.

- Levi AD, Bunge RP, Lofgren JA, Meima L, Hefti F, Nikolics K, Sliwkowski MX (1995) The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation. *J Neurosci* 15:1329–1340.
- Ling BC, Wu J, Miller SJ, Monk KR, Shamekh R, Rizvi TA, Decourten-Myers G, Vogel KS, DeClue JE, Ratner N (2005) Role for the epidermal growth factor receptor in neurofibromatosis-related peripheral nerve tumorigenesis. *Cancer Cell* 7:65–75.
- Maurel P, Salzer JL (2000) Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *J Neurosci* 20:4635–4645.
- Meyer D, Yamaai T, Garratt A, Riethmacher-Sonnenberg E, Kane D, Theill LE, Birchmeier C (1997) Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 124:3575–3586.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700–703.
- Mitrcić D, Huzak M, Curlin M, Gajović S (2005) An improved method for determination of gene copy numbers in transgenic mice by serial dilution curves obtained by real-time quantitative PCR assay. *J Biochem Biophys Methods* 64:83–98.
- Morris RJ, Barber PC, Beech J, Raisman G (1983) The distribution of Thy-1 antigen in the PNS of the adult rat. *J Neurocytol* 12:1017–1039.
- Morrissey TK, Levi AD, Nuijens A, Sliwkowski MX, Bunge RP (1995) Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1431–1435.
- Muse ED, Jurevics H, Toews AD, Matsushima GK, Morell P (2001) Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain. *J Neurochem* 76:77–86.
- Nave KA, Salzer JL (2006) Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16:492–500.
- Nave KA, Schwab MH (2005) Glial cells under remote control. *Nat Neurosci* 8:1420–1422.
- Schroering A, Carey DJ (1998) Sensory and motor neuron-derived factor is a transmembrane heregulin that is expressed on the plasma membrane with the active domain exposed to the extracellular environment. *J Biol Chem* 273:30643–30650.
- Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6:683–690.
- Stewart HJ, Eccleston PA, Jessen KR, Mirsky R (1991) Interaction between cAMP elevation, identified growth factors, and serum components in regulating Schwann cell growth. *J Neurosci Res* 30:346–352.
- Storlazzi CT, Brekke HR, Mandahl N, Brosjö O, Smeland S, Lothe RA, Mertens F (2006) Identification of a novel amplicon at distal 17q containing the BIRC5/SURVIVIN gene in malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Pathol* 209:492–500.
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL (2005) Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47:681–694.
- van Heyningen P, Calver AR, Richardson WD (2001) Control of progenitor cell number by mitogen supply and demand. *Curr Biol* 11:232–241.
- Vega JA, Rodríguez C, Medina M, del Valle ME (1990) Neuron specific enolase (NSE)-like and neurofilament protein (NFP)-like immunoreactivities in the rat dorsal root ganglia and sciatic nerve. *Cell Mol Biol* 36:537–546.
- Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW (2000) Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25:79–91.
- Zheng H, Chang L, Patel N, Yang J, Lowe L, Burns DK, Zhu Y (2008) Induction of abnormal proliferation by nonmyelinating schwann cells triggers neurofibroma formation. *Cancer Cell* 13:117–128.
- Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF (2002) Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* 296:920–922.



S1.- Number of transgene copies. Genomic DNA from two *NSE-hSMDF #2*^(+/-) mice (a and b) and two *NSE-hSMDF #1*^(+/-) mice (c and d) was purified and the Ct for a housekeeping gene (white squares) and for the transgene (black triangles) was calculated (duplicates of two dilutions) using SYBR Green quantitative PCR. Because the amplicon size and qPCR efficiency were identical for the housekeeping and transgene, and because the number of copies of the housekeeping is known (2), the number of copies of the transgene can be determined. Using this approach, the calculated number of copies was 7 and 24 for the line#2 and line #1 respectively. Data are given as mean ± S.E.

S2.- Expression of the transgene in the *NSE-hSMDF #2* line. As in the case of the *NSE-hSMDF #1* line, *in situ* hybridization with a human *hSMDF* probe shows that the transgene is transcribed in neurons (gray matter) but not in glial cells (white matter) in the *NSE-hSMDF #2*^(+/-) mice as well.

S3.- SMDF protein is accumulated in the nervous system of the *NSE-hSMDF* transgenic mice. Brain and sciatic nerve homogenates from wild type and mutant mice were incubated with WGA lectin to concentrate glycosylated proteins. Equivalent amounts of lectin bound proteins were submitted to western blot analysis with anti-HRGβ3 polyclonal antibody. A positive control was performed using extracts of COS-7 cells transfected with a mammalian expression plasmid encoding the cDNA for hSMDF.

S4.- Neural specific expression of the transgene in the *NSE-hSMDF* mice. Total RNA of the indicated tissues from the *NSE-hSMDF #1*^(+/-) mice and wild type littermates was prepared, transcribed to cDNA and submitted to PCR with specific primers for the human SMDF. As is shown, hSMDF is expressed in nervous tissues (forebrain, cerebellum, spinal cord, trigeminal ganglia and dorsal root ganglia) but not in non-nervous tissues (heart, kidney and liver). The absence of amplicon in a “false” retrotranscription (without retrotranscriptase) rules out genomic contamination. A housekeeping gene (SREBP2) was amplified to check the adequate quality of the cDNA.

S5.- Transgene expression downregulates myelin protein markers also in the *NSE-hSMDF #2*^(+/-) line. The mRNA for P0, MBP, CNPase and HMGCoA reductase is also downregulated in the sciatic nerves of the *NSE-hSMDF #2*^(+/-) mice. cDNA from P20 mutant mice and wild type littermates was analyzed for the expression of myelin protein markers by qPCR and normalized to a housekeeping gene (18S). Two mice were used for MBP, P0 and CNPase. Data are given as mean ± S.E. The values depicted for HMGCoA reductase correspond to only one mouse per genotype.

S6.- Overexpression of hSMDF increases cellularity in the *NSE-hSMDF #2*^(+/-) line. Although less dramatically, transgene expression also increases the number of nucleated cells in the P20 sciatic nerves of the *NSE-hSMDF #2*^(+/-) line. Sciatic nerves sections from *NSE-hSMDF #2*^(+/-) and wild type littermates were stained with bisbenzimidazole and confocal microscopy images were obtained. **A.-** Sciatic nerve section area is only slightly increased in the mutant mice. **B.-** By contrast, the number of cells (nuclei) and density (**C**) is notably increased in the mutant mice.

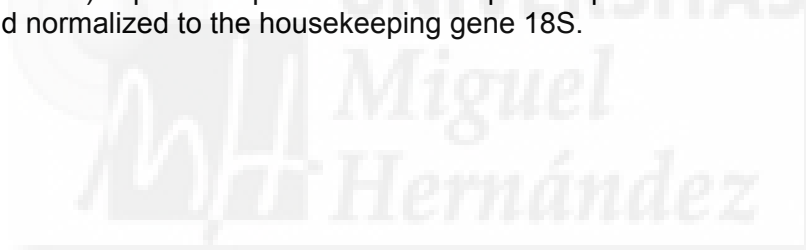
S7.- All the Remak bundles are atypical in the *NSE-hSMDF #1*^(+/-) sciatic nerves. To estimate how frequent the abnormal Remak bundles in the mutant mice are, we counted the number of bundles of Remak with a standard structure and the number of atypical Remak bundles (both myelinated bundles and non yet myelinated bundles, classified as “pre-

myelinating complexes"). As is shown, no atypical structures were found in the wild type animals, whereas no standard bundles could be detected in the transgenic animals. More than 170 bundles were counted per genotype. Data comes from 4 animals per genotype.

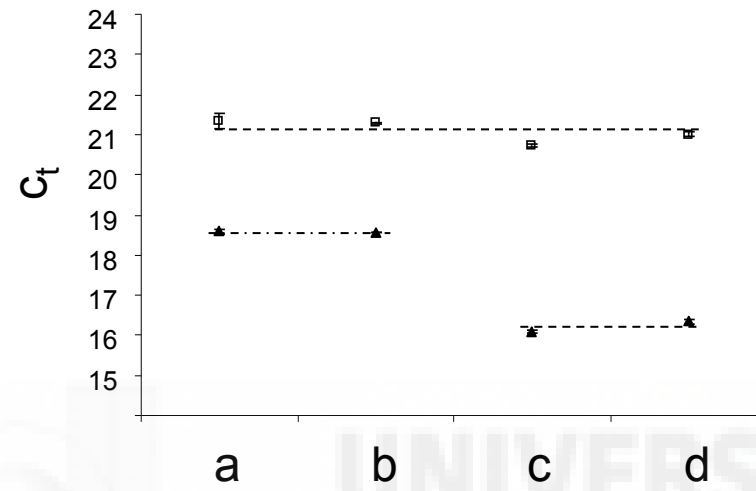
S8.- The amplitude of depolarization is significantly decreased in electrophysiological recordings of myelinated fibres from the transgenic mice. Not only the nerve conduction velocity but also amplitude is lower in the *NSE-hSMDF* mutants, reflecting probably the drop in axon diameter. Amplitude was measured in compound action potentials obtained from sciatic nerves of *NSE-hSMDF #1*^(+/+) and wild type littermates. n= 4 mice per genotype. Data are given as mean ± S.E. (* P<0,05 Student's t test).

S9.- Postnatal expression pattern of Thy1 and NSE mRNA in the dorsal root ganglia of mice. The mRNA for Thy1 and NSE genes was estimated by qPCR in wild type mice at P0, P10 and P20 and normalized against 18S. As is shown, the expression of both genes increases postnatally, suggesting that both promoters are activated during postnatal development.

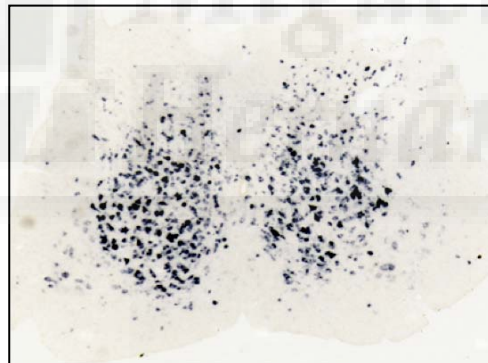
S10.- Developmental expression pattern of the NSE-hSMDF transgene in the PNS neurons of the mutant mice. Transgene expression is activated during postnatal development in transgenic mice. However, mRNA levels do not reproduce exactly the expression pattern of the endogenous gene, as has been previously suggested (Forss-Petter et al, 1990). qPCR experiments with specific primers for the hSMDF were performed and normalized to the housekeeping gene 18S.



S1

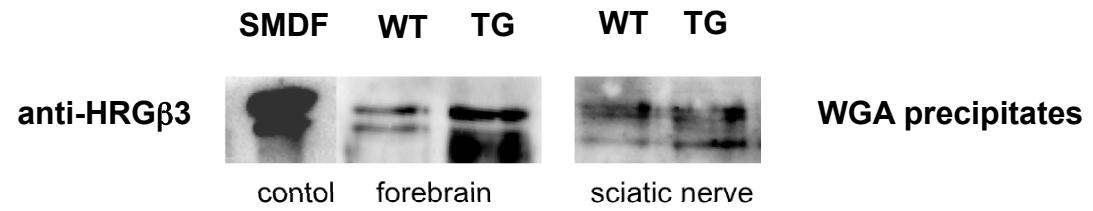


S2

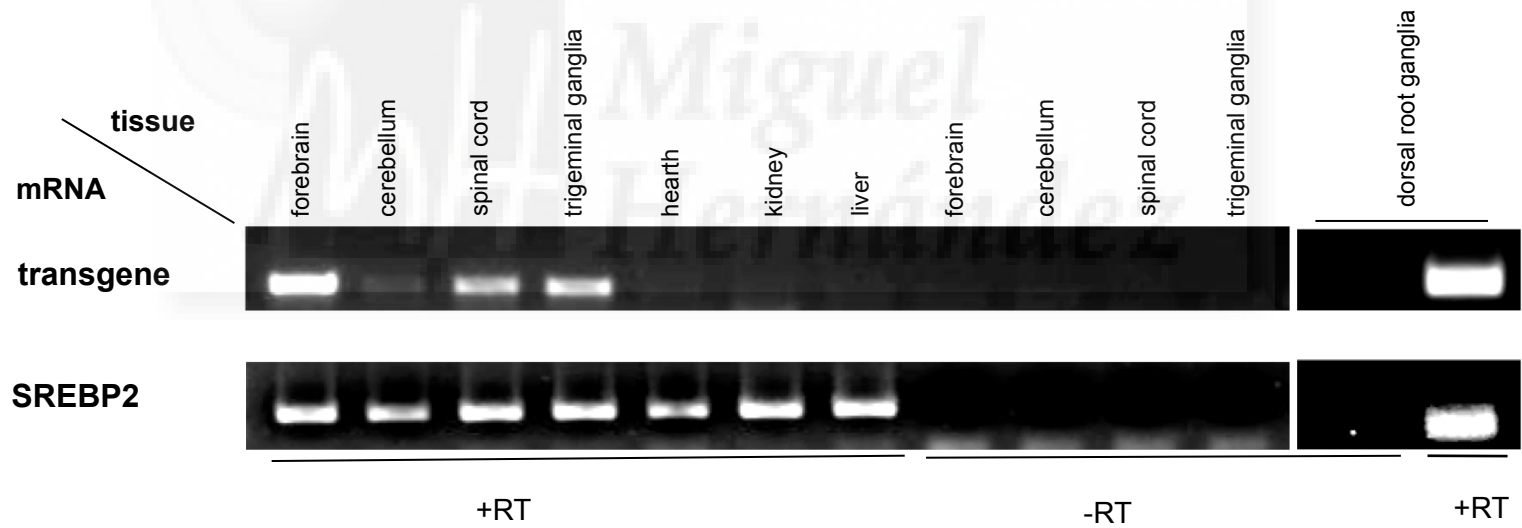


NSE-SMDF #2 (+/-)

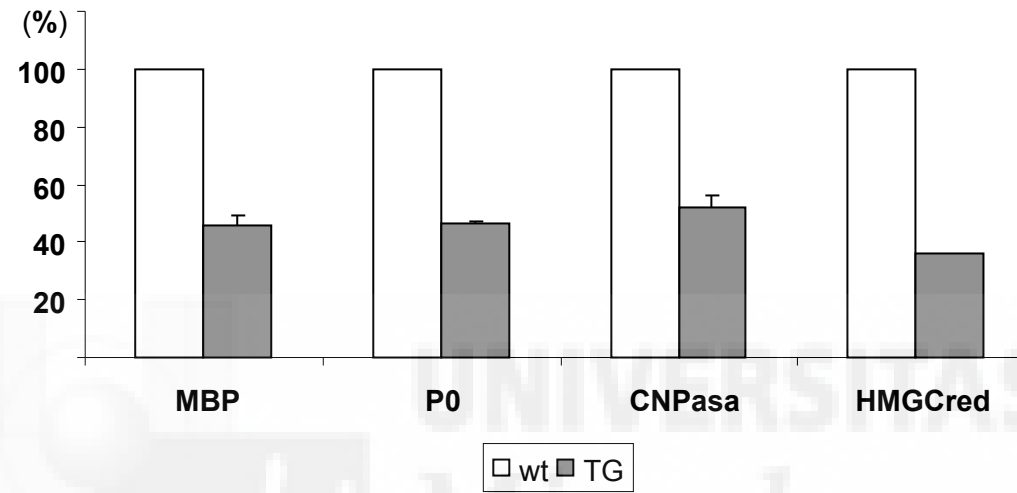
S3



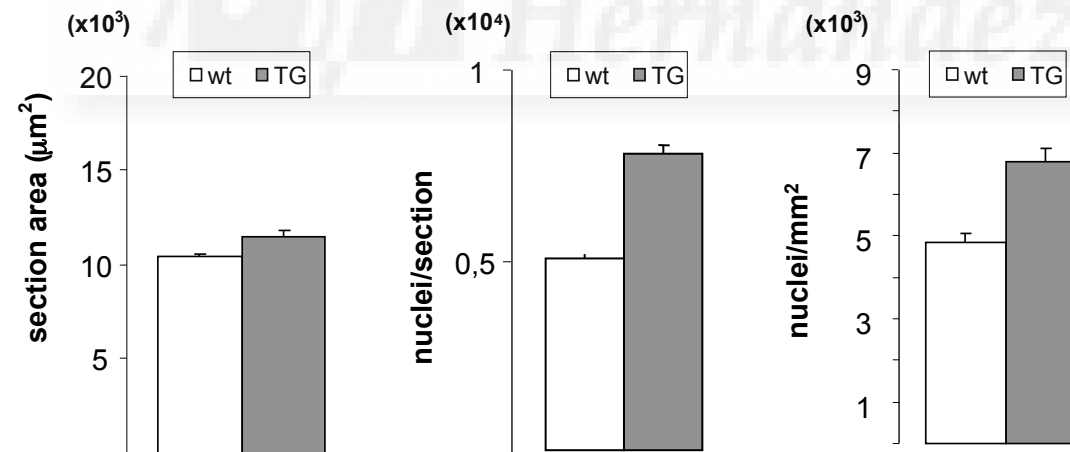
S4



S5



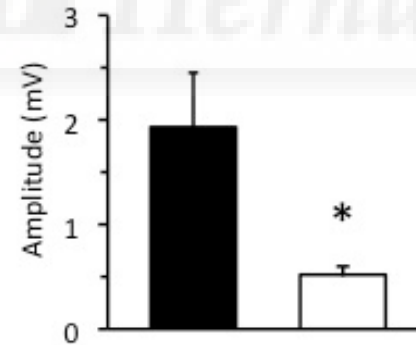
S6



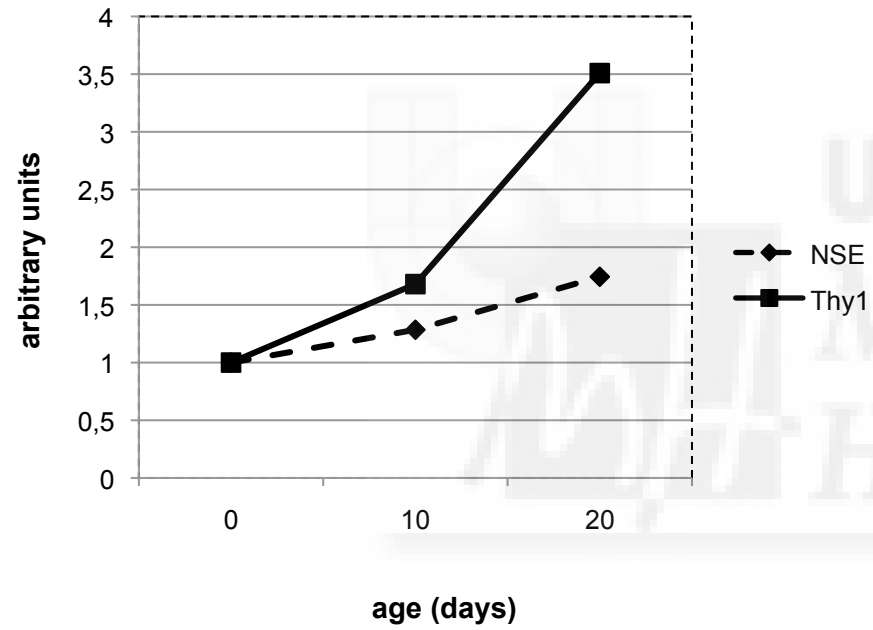
S7

	Remak bundles	Atypical Remak bundles	
		Pre-myelinated complex	Myelinated bundles
WT littermates	176	0	0
<i>NSE-hSMDF#1</i> (+/-)	0	139	32

S8



S9



S10

