



# Papel de las HDACs de la Clase IIa en la Biología de las Células de Schwann

Tesis doctoral presentada por:  
*Sergio Velasco Avilés*

Director de tesis:  
*Dr. Hugo Cabedo Martí*

- 2020 -

*Programa de Doctorado en Neurociencias  
Instituto de Neurociencias – UMH-CSIC*







San Juan de Alicante, 29 de Octubre de 2020

A quien le concierne,

La tesis doctoral titulada “Papel de las HDACs de la Clase IIa en la Biología de las Células de Schwann” ha sido desarrollado por mí, Sergio Velasco Avilés. Esta tesis se presenta en un formato por compendio de trabajos previamente publicados. Se basa en estudios experimentales realizados en el Instituto de Neurociencias de Alicante durante el programa de doctorado en neurociencias de la Universidad Miguel Hernández.

Atentamente.

Sergio Velasco Avilés



San Juan de Alicante, 29 de Octubre de 2020

A quien le concierne,

La tesis doctoral “Papel de las HDACs de la Clase IIa en la Biología de las Células de Schwann” ha sido desarrollado por mí, Sergio Velasco Avilés. Esta tesis incluye las siguientes dos publicaciones, de las que en el primer caso soy coautor mientras que en el segundo caso soy el primer autor. Declaro que las publicaciones no se han utilizado y no se utilizarán en ninguna otra tesis de acuerdo con mi director de tesis, el Dr. Hugo Cabedo Martí.

“Class IIa histone deacetylases link cAMP signaling to the myelin transcriptional program of Schwann cells”. Clara Gomis-Coloma, Sergio Velasco-Aviles, Jose A. Gomez-Sanchez, Angeles Casillas-Bajo, Johannes Backs y Hugo Cabedo. **Journal of Cell Biology** (2018). <https://doi.org/10.1083/jcb.201611150>.

“Class IIa HDACs in myelination”. Sergio Velasco-Aviles, Jose A. Gomez-Sanchez y Hugo Cabedo. **AGING** (2018). <https://doi.org/10.18632/aging.101443>.

Atentamente.

Sergio Velasco Avilés

Dr. Hugo Cabedo Martí



San Juan de Alicante, 29 de Octubre de 2020.

El Dr. Hugo Cabedo Martí, Investigador Científico del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL).

AUTORIZA la presentación de la Tesis Doctoral titulada “Papel de las HDACs de la Clase IIa en la Biología de las Células de Schwann” realizada por Don Sergio Velasco Avilés bajo mi inmediata dirección y supervisión como director de su Tesis Doctoral en el Instituto de Neurociencias (UMH-CSIC) y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dr. Hugo Cabedo Martí



San Juan de Alicante, 29 de Octubre de 2020

Dr. Miguel Valdeolmillos López, Catedrático y Coordinador del programa de doctorado en Neurociencias del Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

**CERTIFICO:**

Que la Tesis Doctoral titulada “Papel de las HDACs de la Clase IIa en la Biología de las Células de Schwann” ha sido realizada por Don Sergio Velasco Avilés, bajo la dirección del Dr. Hugo Cabedo Martí; y doy mi conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dr. Miguel Valdeolmillos López

E-mail :  
miguel.valdeolmillos@umh.es  
www.in.umh.es

Tel: +34 965 919540  
Fax: +34 965 919549

Av. Ramón y Cajal s/n  
CAMPUS DE SANT JOAN  
03550 SANT JOAN D'ALACANT-  
ESPAÑA

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	9
<b>Resumen</b> .....	11
<b>Introducción</b> .....	13
1. Desarrollo de las células de Schwann .....	13
2. Mielinización .....	14
3. La respuesta de las células de Schwann a la lesión .....	17
4. Regulación epigenética de la mielinización .....	19
<b>Objetivo</b> .....	23
<b>Materiales &amp; Métodos</b> .....	24
1. Animales .....	24
2. Lesión de nervio ciático in vivo .....	25
3. Microscopía electrónica .....	26
4. Técnicas de cultivo .....	27
5. Trasfecciones .....	30
6. Infecciones .....	31
7. Inmunofluorescencia .....	33
8. Coinmunoprecipitaciones .....	35
9. Western blot .....	37
10. ChIPs .....	41
11. qPCR .....	44
<b>Resultados</b> .....	49
<b>A) Mecanismos moleculares que median la mielinización</b> .....	49
1. El cAMP induce la traslocación nuclear de la HDAC4 en las células de Schwann.....	49
2. La fosforilación por la PKA regula la traslocación nuclear de la HDAC4 producida por el cAMP en las células de Schwann .....	52
3. La eliminación de la HDAC4 bloquea la actividad diferenciadora del cAMP en las células de Schwann .....	55
4. La activación de la HDAC4 es suficiente para bloquear la expresión de c-Jun .....	57
5. La HDAC4 se une al promotor de c-Jun y bloquea su expresión mediante un mecanismo independiente de Mef-2 en las células de Schwann .....	57
6. La HDAC4 recluta la actividad desacetilasa de otras HDACs para bloquear la expresión de c-Jun en las células de Schwann .....	60
7. La traslocación nuclear de la HDAC4 inicia la expresión genética del programa de mielinización en las células de Schwann .....	62
8. Estudio de la expresión de las HDACs de la clase IIa en el SNP durante el desarrollo pos-embriionario y después de la lesión .....	65
<b>B) Papel de las HDACs IIa en el desarrollo de la mielina</b> .....	67
9. Efectos de la eliminación de la HDAC4 en la mielinización del SNP .....	67
10. Efectos de la eliminación de la HDAC5 en la mielinización del SNP .....	71
11. Efectos de la eliminación de la HDAC7 en la mielinización del SNP .....	73
12. Efectos de la eliminación de las HDAC4/5 en la mielinización del SNP .....	75
13. Efectos de la eliminación de las HDAC4/5/7 en la mielinización del SNP ...	79

<b>C) Papel de las <i>HDACs IIa</i> en la regeneración y la remielinización después de la lesión</b> .....	82
14. Efectos de la eliminación de la HDAC4 en la re-mielinización del SNP después de la lesión .....	82
15. Efectos de la eliminación de la HDAC5 en la re-mielinización del SNP después de la lesión .....	89
16. Efectos de la eliminación de la HDAC7 en la re-mielinización del SNP después de la lesión .....	94
17. Efectos de la eliminación de las HDAC4/5 en la re-mielinización del SNP después de la lesión .....	99
18. Efectos de la eliminación de las HDAC4/5/7 en la re-mielinización del SNP después de la lesión .....	108
<b>Discusión</b> .....	118
<b>Conclusiones</b> .....	126
<b>Bibliografía</b> .....	127
<b>Agradecimientos</b> .....	134
<b>Anexo</b> .....	135
1. Class IIa histone deacetylases link cAMP signaling to the myelin transcriptional program of Schwann cells	
2. Class IIa HDACs in myelination	



## ABREVIATURAS

Ad	<i>Adenovirus</i> Adenovirus
AU	<i>Arbitrary Unit</i> Unidad Arbitraria
bSC	<i>Bungner Schwann Cell</i> Célula de Schwann de Reparación o Célula de Bungner
CaMKII	<i>Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II</i> Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina Proteína Quinasa II
cAMP	<i>3',5'-cyclic Adenosine Monophosphate Cyclase</i> Adenosín Monofosfato-3',5' cíclico
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i> Ácido Desoxirribonucleico Complementario
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i> Unidades Formadoras de Colonias
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i> Inmunoprecipitación de Cromatina
cKO	<i>Conditional Knock-out</i> Gen Interrumpido de manera Condicional
CMV	<i>Cytomegalovirus</i> Citomegalovirus
CoIP	<i>Co-Immunoprecipitation</i> Co-inmunoprecipitación
dbcAMP	<i>Dibutyryl-cAMP</i> Dibutiril-cAMP
dKO	<i>Double Knock-out</i> Dos Genes Interrumpidos
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> Ácido Desoxirribonucleico
EPAC	<i>Exchange Protein Activated by cAMP</i> Intercambiador de Proteínas Activado por cAMP
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> Suero Bovino Fetal
FC	<i>Fold Change Injured vs Uninjured</i> Incremento del mRNA lesionado vs no lesionado
FSK	<i>Forskolin</i> Forskolina
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> Proteína Verde Fluorecente
Gpr126	<i>G Protein Coupled Receptor</i> Receptor Acoplado a Proteína G
HDAC	<i>Histone Deacetylase</i> Histonas Deacetilasas

HMGR	<i>3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase</i> 3-Hidroxi-3-Metilglutaril-Coenzima A Reductasa
JNK	<i>Jun N-terminal kinases</i> Jun N-terminal Quinasa
KO	<i>Knock-out</i> Gen Interrumpido
Lv	<i>Lentivirus</i> Lentivirus
mSC	<i>Myelinating Schwann Cell</i> Célula de Schwann Mielinizante
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> Tampón Fosfato Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFA	<i>Paraformaldehyde</i> Paraformaldehído
PKA	<i>Protein Kinase A</i> Proteína Quinasa A
PKD	<i>Protein Kinase D</i> Proteína Quinasa D
SNP	<i>Peripheral Nervous System</i> Sistema Nervioso Periférico
qPCR	<i>Quantitative-real Time PCR</i> PCR Cuantitativa en Tiempo Real
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> Ácido ribonucleico
SC	<i>Schwann Cell</i> Célula de Schwann
shRNAi	<i>Short Hairpin RNA</i> RNA de Interferencia
SIK	<i>Salt-Inducible Kinase</i> Quinasa Inducible por Sal
TA	Temperatura Ambiente
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> Microscopía Electrónica de Transmisión
tKO	<i>Triple Knock-out</i> Tres Genes Interrumpidos
UI	<i>Uninjured</i> No Lesionado
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cells</i> Células del Músculo Liso Vascular
WT	<i>Wild Type</i> Tipo Salvaje

**RESUMEN**

El incremento del cAMP en las células de Schwann, provocado por la activación del Gpr126, produce el bloqueo de la expresión de *c-Jun*, e induce la expresión de *Krox-20*, lo que acaba desencadenando la mielinización del Sistema Nervioso Periférico. Como resultado de mi trabajo de doctorado, hemos descubierto que el aumento del cAMP en las células de Schwann provoca la translocación nuclear de la HDAC4 (una histona deacetilasa perteneciente a la clase IIa) mediada por la fosforilación de las serinas S265/S266 por la PKA. Una vez dentro del núcleo la HDAC4 se une al promotor de *c-Jun* donde, formando un complejo con NCoR1, recluta a la HDAC3, una histona deacetilasa perteneciente a la clase I. Esta desacetila la lisina 9 de la histona 3 e impide que las células de Schwann expresen *c-Jun*. El bloqueo de la expresión de *c-Jun* fuerza a las células de Schwann a salir del ciclo celular y activar el programa genético de la mielinización, dirigido por *Krox-20*.

Usando modelos de ratones *KOs* condicionales para las HDACs de la clase IIa he demostrado que la eliminación de estas proteínas en las células de Schwann provoca un retraso en la transición de célula inmadura a diferenciada, produciendo un retraso en la mielinización del Sistema Nervioso Periférico durante el desarrollo postembrionario. Este retraso es probablemente consecuencia de la deficiencia en el adecuado silenciamiento de la expresión de *c-Jun*.

Además, he mostrado que la eliminación de las HDACs de la clase IIa en las células de Schwann provoca un retraso en la remielinización que se produce habitualmente durante la regeneración de los nervios periféricos después de una lesión. La ausencia de estas proteínas dificulta el silenciamiento de *c-Jun*, retrasando la transición de célula de Schwann de reparación a mielinizante. Además, debido a la ausencia de este sistema de represión, hay un adelanto en la expresión de *c-Jun* después de producirse el daño, lo que acelera la degeneración Walleriana.

Este trabajo de doctorado demuestra la existencia de un mecanismo epigenético, sensible al cAMP y mediado por las HDAC de clase IIa, que regula la diferenciación de la célula de Schwann mielinizante.

**ABSTRACT**

The increase in cAMP in Schwann cells, caused by the activation of Gpr126, blocks the expression of c-Jun, and induces the expression of Krox-20, which ends up triggering the myelination of the Peripheral Nervous System. As a result of my doctoral work, we have discovered that increased levels of cAMP in Schwann cells causes nuclear translocation of HDAC4 (a histone deacetylase belonging to class IIa) mediated by phosphorylation of serines S265 / S266 by PKA. Once inside the nucleus, HDAC4 binds to the c-Jun promoter and forms a complex with NcoR1 and recruits HDAC3, a class I histone deacetylase. This deacetylates lysine 9 of histone 3 and blocks cJun expression in Schwann cells. Blocking c-Jun expression forces Schwann cells to exit the cell cycle and activate the genetic program of myelination, driven by Krox-20.

Using conditional KOs mouse models for class IIa HDACs, I have shown that the elimination of these proteins in Schwann cells causes a delay in the transition from immature to differentiated cells, producing a delay in the myelination of the Peripheral Nervous System during the post-embryonic development. This delay is probably a consequence of the deficiency in the adequate silencing of c-Jun expression.

Furthermore, I have shown that the elimination of class IIa HDACs in Schwann cells causes a delay in remyelination that usually occurs during regeneration of peripheral nerves after injury. The absence of these proteins hinders the silencing of c-Jun, delaying the transition from Schwann cell from repair to myelinating. Furthermore, due to the absence of this repression system, there is an increase in the expression of c-Jun after the damage has occurred, which accelerates the Wallerian degeneration.

This doctoral work demonstrates the existence of an epigenetic mechanism, sensitive to cAMP and mediated by HDAC class IIa, that regulates the differentiation of the myelinating Schwann cell.

## INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso está compuesto por neuronas y células gliales. Las neuronas son las células especializadas en la transmisión de la información nerviosa en forma de potenciales de acción. A lo largo de la evolución aparecieron diferentes mecanismos que incrementaron la velocidad de la transmisión nerviosa, una de las más relevantes, y que ha permitido la aparición de nuestra propia especie, ha sido la mielina. Apareció por primera vez durante el Devónico (417 a 354 millones de años) y se cree que favoreció el desarrollo de los placodermos, una clase extinta de peces primitivos en los que por primera vez se pueden observar mandíbulas y que originan el clado de los gnatostomados dentro de los vertebrados (Zalc, 2016).

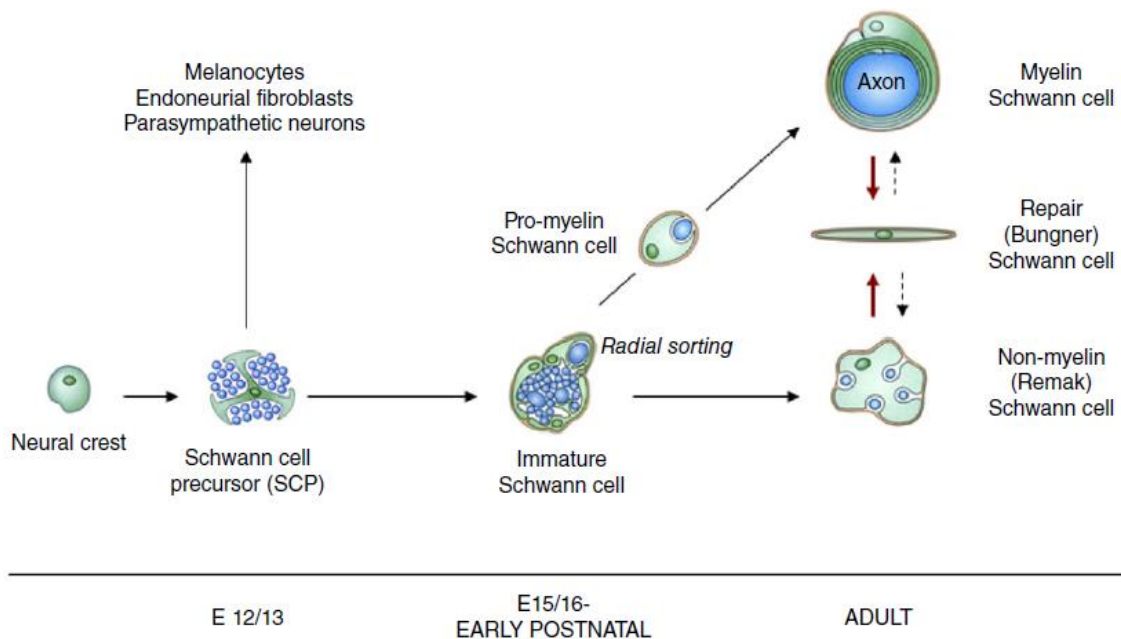
La mielina fue descrita por primera vez por el Dr. Robert Remak en 1838, cuando habló de la coexistencia en los nervios periféricos de dos tipos de fibras, unas desnudas y otras envueltas por una gruesa vaina (Remak, 1839; Zalc, 2016). Pero fue el Dr. Rudolf Ludwig Karl Virchow quien en 1854 propuso el nombre mielina para referirse a esa vaina gruesa que envuelve a los axones (Virchow, 1854; Zalc, 2016).

La mielina es una membrana multilamelar formada por la extensión de la membrana plasmática de las células gliales que se enrolla sobre el axón. En el Sistema Nervioso Central los oligodendrocitos generan múltiples vainas de mielina entorno al mismo o a diferentes axones, mientras que en el Sistema Nervioso Periférico las células de Schwann solo generan una vaina de mielina entorno a un solo axón. La mielina protege a los axones del entorno y permite que el potencial de acción se transmita de manera saltatoria. Esto aumenta la velocidad de conducción nerviosa y además genera un enorme ahorro energético y de espacio (Garbay et al., 2000).

### 1. Desarrollo de las células de Schwann.

Las células de Schwann se originan en la cresta neural (revisado en (Jessen and Mirsky, 2005; Woodhoo and Sommer, 2008)). Desde su origen, y a lo largo de toda su vida, las células de Schwann expresan el factor de transcripción Sox10<sup>+</sup> y se encuentran íntimamente asociadas a los axones, generándose entre ambos una relación de mutua dependencia. Durante la primera fase del desarrollo (E12-13 en ratón, ver Figura 1) se generan los precursores de las células de Schwann (SCP del inglés *Schwann cell precursors*) que derivan de la migración ventral de las células de la cresta neural (Jessen and Mirsky, 2005, 2019a). En esta fase temprana del desarrollo del Sistema Nervioso Periférico todavía no hay vascularización, por lo que la integridad axonal depende directamente del soporte nutricional y energético que les suministra las células de Schwann precursoras, mientras que la supervivencia celular de las propias células de Schwann precursoras depende de la expresión axonal de NRG1 tipo III, a través de los receptores ErbB2/3 expresados en su superficie (Hancock et al., 2011). A continuación, las células de Schwann precursoras se convierten en células de Schwann inmaduras (E15-17 hasta postnatal, en ratón). A diferencia de las primeras, las células de Schwann inmaduras se encuentran conectadas con la lámina basal y son autosuficientes: su supervivencia ya no depende del contacto directo con los axones. Además, durante esta etapa del desarrollo del Sistema Nervioso Periférico se inicia la vascularización y la formación del tejido

conectivo, apareciendo las primeras capas del perineuro. Las células de Schwann precursoras también generan fibroblastos (Jessen and Mirsky, 2005, 2019a).



**Figura 1. El linaje de las células de Schwann.** El diagrama muestra las etapas clave del desarrollo de la célula de Schwann. Las flechas indican transiciones relacionadas con el desarrollo y las lesiones. Flechas negras continuas: desarrollo normal. Flechas rojas: la respuesta a la lesión de la célula de Schwann. Flechas punteadas: reprogramación posterior a la reparación de la célula de Schwann mielinizante y de Remak. Las fechas embrionarias (E) se refieren al desarrollo del ratón (Jessen and Mirsky, 2016).

Poco antes del nacimiento del animal las células de Schwann inmaduras comienzan a diferenciarse en células de Schwann pro-mielinizantes, coincidiendo con la detención de la proliferación y la migración celular. En este momento existen paquetes de axones que están rodeados por 6 a 8 células de Schwann, y que comparten la misma lámina basal formando lo que se denomina “familias de células de Schwann”. Después del nacimiento se produce el *radial sorting* (clasificación o selección radial), el cual en el caso de los roedores transcurre durante los primeros 10 días de vida. Durante este proceso de morfogénesis, la célula de Schwann realiza su última mitosis, eligiendo a un solo axón con el que establece una relación 1:1. Si el axón elegido por la célula de Schwann mide más de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, se activa el programa de mielinización provocando la diferenciación a célula de Schwann mielinizante. Primero la célula de Schwann mielinizante produce la defasciculación del axón elegido a través de la deposición de su propia lamina basal entre el axón y ella antes de iniciar la mielinización. El resto de axones de menos de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro son agrupados y separados por prolongaciones citoplásmicas de las células de Schwann no mielinizantes generando los haces de Remak (Feltri et al., 2016; Jessen and Mirsky, 2005, 2019a).

## 2. Mielinización.

Existen varios agentes y vías de señalización celular que determinan la diferenciación de las células de Schwann pro-mielinizantes a mielinizantes después del *Radial sorting*, entre los cuales hay que destacar la NRG1 tipo III expuesta en la

superficie de los axones, y el receptor acoplado a proteínas G 126 (Gpr126) expresado por las células de Schwann (Salzer, 2015).

La cantidad de NRG1 tipo III que expresan los axones en su superficie está correlacionado directamente con el diámetro axonal. Se cree que por ese motivo sólo los axones de más de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro activan el programa de mielinización. Esto también explicaría el que exista una correlación directa entre el diámetro axonal y el grosor de la mielina que lo envuelve, definido por la razón o proporción  $g$  (en inglés *g-ratio* = diámetro axonal / diámetro total de la fibra) que normalmente se encuentra entorno de 0.67 para las fibras del SNP (Garratt et al., 2000; Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005).

El receptor Gpr126, localizado en la membrana de las células de Schwann, es necesario para que se active el programa de mielinización (Monk et al., 2009; Monk et al., 2011), aunque no lo es para el mantenimiento posterior de la mielina (Glenn and Talbot, 2013a, b). Se ha sugerido que *in vivo* sus ligandos son el colágeno tipo IV (Paavola et al., 2014) y la laminina 211 (Petersen et al., 2015), ambos componentes de la matriz extracelular. El Gpr126 activa la adenilato ciclasa, elevando el cAMP intracelular, lo que acaba activando la PKA y provoca la activación del programa genético que determina la formación de la capa de mielina (Bacallao and Monje, 2013; Glenn and Talbot, 2013a, b; Guo et al., 2013; Mogha et al., 2013).

Para que se pueda iniciar la expresión del programa genético de la mielinización primero se deben de silenciar los reguladores negativos de la mielinización (*c-Jun*, *Notch*, *Sox-2*), los cuales son expresados de manera constitutiva bloqueando la expresión de los reguladores positivos de la mielinización (*Krox20*, *Oct-6*, *Sox-10*) (Jessen and Mirsky, 2008).

Entre los reguladores negativos de la mielinización es de destacar *c-Jun*, gen que codifica para un factor de transcripción perteneciente a la familia Jun (junto a *JunB* y *JunD*). Además, es el principal componente del complejo AP-1 (Mechta-Grigoriou et al., 2001). *c-Jun* participa en múltiples procesos celulares, y su actividad depende de la fosforilación de su extremo N-terminal producida por la Jnk (Jun kinasa). El factor de transcripción *c-Jun* se une al motivo AP-1 de su propio promotor induciendo su expresión en claro ejemplo de mecanismo de retroalimentación positivo (Angel et al., 1988). *c-Jun* se expresa en las células de Schwann inmaduras durante la fase tardía del desarrollo embrionario y en los nervios de los neonatos. En estas células *c-Jun* inhibe la expresión de *Krox20*, lo que detiene la transición de célula de Schwann pro-mielinizante a mielinizante. Además, induce la proliferación celular (Fazal et al., 2017; Jessen and Mirsky, 2008; Parkinson et al., 2008; Parkinson et al., 2004). Otro de los reguladores negativos es *Notch*. Este es un receptor transmembrana que, después de unirse a su ligando, es escindido, generando un fragmento intracelular que una vez dentro del núcleo actúa como regulador transcripcional (Schweisguth, 2004). *Notch* promueve la generación de células de Schwann inmaduras a partir de las células de Schwann precursoras, regula la población de células de Schwann controlando la proliferación celular y detiene a las células de Schwann en el estado pro-mielinizantes inhibiendo la mielinización (Jessen and Mirsky, 2008; Woodhoo et al., 2009). Se sabe que *Notch* induce la expresión de *Hey2* el cual bloquea la expresión del regulador positivo de la mielinización *Krox20* (Wu et al., 2016). *Sox-2*, otro de los reguladores negativos de la mielinización, es un factor de transcripción perteneciente a la familia

SOX (*SRY-related HMG-box genes*) (Kamachi et al., 2000). Sox-2, junto a *c-Jun*, se expresa en las células de Schwann inmaduras, y al igual que *c-Jun*, inhibe la expresión de *Krox-20*, bloqueando la transición hacia la célula de Schwann mielinizante. Además, también induce la proliferación celular (Jessen and Mirsky, 2008; Le et al., 2005; Roberts et al., 2017).

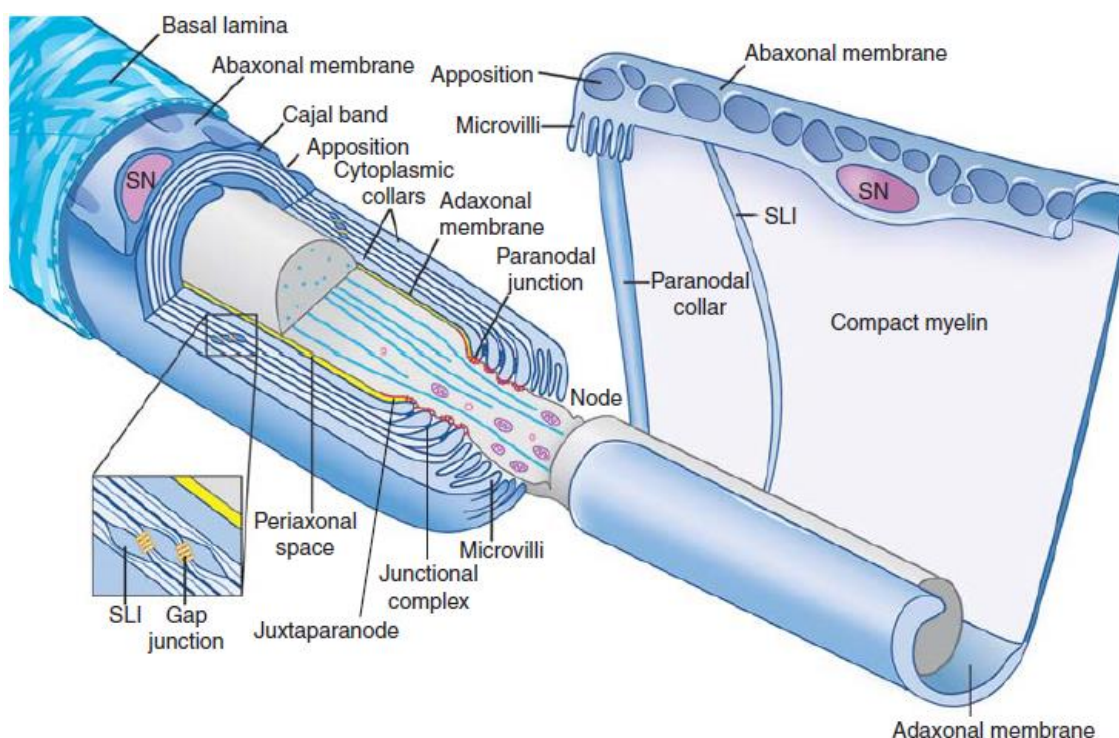
En cuanto a los reguladores positivos de la mielinización, es de destacar el gen *Sox-10*. Este codifica para un factor de transcripción que se expresa en las células de la cresta neural y se mantiene a lo largo de toda la vida de las células de Schwann. De hecho, se ha demostrado que su expresión es necesaria para el correcto desarrollo de las células de Schwann, el mantenimiento del sistema nervioso periférico y la remielinización después de la lesión (revisado en (Jessen and Mirsky, 2005, 2008)). *Sox-10* induce su propia expresión y la de *Oct-6*, y juntos tienen un papel muy importante en la diferenciación de las células de Schwann pro-mielinizantes hacia las mielinizantes (Bermingham et al., 1996; Jaegle et al., 1996). Otro regulador positivo es *Krox20*, el gen maestro necesario y esencial para la activación del programa genético de la mielinización. Su expresión provoca la transición de la célula de Schwann pro-mielinizante hacia la célula de Schwann mielinizante (Topilko et al., 1994). Además es esencial para el mantenimiento de la mielina (Decker et al., 2006). *Krox20* provoca la salida del ciclo celular, promueve la resistencia a la apoptosis e induce la expresión de los genes de la mielina (*Mpz*, *Periaxina* y *Pmp22* entre otros) favoreciendo la mielinización axonal (Jessen and Mirsky, 2008; Jones et al., 2011; LeBlanc et al., 2006; Tammia et al., 2018; Zorick et al., 1999). Además, *Krox20* inhibe la expresión de *c-Jun* al inducir la expresión de *Jip-1*, una proteína que se une a la *Jnk* bloqueando su actividad quinasa sobre *c-Jun* (Parkinson et al., 2004). Para que se produzca el inicio de la expresión de *Krox20* en las células de Schwann pro-mielinizantes, *Oct-6* y *Sox-10* se tienen que encontrar unidos a su promotor, a la espera de que el cAMP produzca la eliminación de los reguladores negativos de la mielinización (Mirsky and Jessen, 1996; Svaren and Meijer, 2008).

La célula de Schwann al mielinizar al axón adquiere una enorme polarización celular longitudinal. Como resultado de ello aparecen distintos compartimentos: nodo de Ranvier, paranodo, juxtapanodo e internodo. También adquiere una polarización radial debido a las múltiples vueltas de la membrana citoplasmática que envuelve al axón, apareciendo distintos dominios: lamina basal, membrana abaxonal, mielina compacta, membrana adaxonal y axón (ver Figura 2). El internodo es el dominio más largo y supone el 99 % de la longitud total de la célula de Schwann mielinizante. El 1% restante está compuesto por la suma del nodo de Ranvier, el paranodo y el juxtapanodo. El nodo de Ranvier es la región del axolema que se encuentra entre dos vainas de mielina adyacentes, mide de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud y en él se localiza la maquinaria molecular que permite la transmisión del potencial de acción. Los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje se encuentran concentrados en el centro del nodo y están flanqueados por los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje (Kidd et al., 2013; Salzer and Zalc, 2016). La membrana adaxonal se encuentra separada de la membrana del axón (axolema) por un espacio de unos 15 nm (espacio periaxonal) que se encuentra enriquecido en moléculas de adhesión y receptores que median las interacciones entre las células de Schwann y los axones. La membrana abaxonal media interacciones con la laminina basal a través de diferentes integrinas. Entre estas



dos membranas se encuentra la mielina compacta, resultado de las vueltas en espiral de la membrana plasmática de la célula de Schwann entorno al axón.

La mielina, está compuesta en un 70 % por lípidos, se encuentra enriquecida en colesterol (esencial para el correcto ensamblaje de la mielina) glucoesfingolípidos con ácidos grasos de cadena larga saturados. Además, la mielina compacta se encuentra enriquecida en ciertas proteínas estructurales con función estabilizadora (como Mbp, Mpz y Pmp22). La mielina compacta se encuentra interrumpida por las hendiduras de Schmidt–Lanterman que forman canales de comunicación a través de los cuales se transportan nutrientes y metabolitos energéticos (como el piruvato) que la célula de Schwann suministra al axón (Kidd et al., 2013; Salzer and Zalc, 2016).



**Figura 2. Organización de la célula de Schwann mielinizante.** Organización esquemática de la célula de Schwann mielinizante (azul) que rodea a un axón (gris); la parte izquierda muestra una sección transversal longitudinal de una vaina de mielina y la parte derecha muestra el inicio de la mielinización (Salzer and Zalc, 2016).

### 3. La respuesta de las células de Schwann a la lesión.

A diferencia de lo que ocurre en el sistema nervioso central, después de producirse una lesión en el sistema nervioso periférico, se activa un complejo mecanismo orquestado por las células de Schwann que permite la regeneración y la re-mielinización axonal (Jessen and Arthur-Farraj, 2019; Jessen and Mirsky, 2016, 2019b; Jessen et al., 2015a; Jessen et al., 2015b) y el restablecimiento de la función nerviosa.

Los dos mayores tipos de lesiones en el Sistema Nervioso Periférico son la *axonotmesis* y la *neurotmesis* (Burnett and Zager, 2004). En la *axonotmesis* se produce la ruptura de los axones sin verse dañados la lámina basal ni el tejido conectivo. Este mecanismo se reproduce en los modelos de lesión por *crush* en roedores. Tras la lesión se activa la *degeneración Walleriana*, un término engañoso ya

que, si bien inicialmente se produce la degeneración axonal, el objetivo de este mecanismo es orquestar la regeneración de los nervios. Así, a partir del segundo día después de la lesión, la porción distal de los axones seccionados en el muñón distal degenera. Las células de Schwann, tras deshacerse de la mielina (mielinofagia) forman las bandas de Bungner, estructuras especializadas en forma de tubo que guían a los axones hacia sus tejidos diana. La regeneración axonal se ve muy favorecida ya que las bandas de Bungner sirven de guía al cono axonal, el cual lo atraviesa a una velocidad aproximada de 1,5 mm/día (Gomez-Sanchez et al., 2017). Cuando los axones reinervan los tejidos y vuelven a contactar con las células de Schwann dentro del muñón distal, se produce la re-mielinización, recuperándose la funcionalidad del nervio a las 3 o 4 semanas (Jessen and Mirsky, 2016).

En la *neurotmesis* se produce una ruptura total del sistema nervioso periférico. Es lo que ocurre como resultado de los modelos de lesión por corte en roedores (*cut*). En este tipo de lesión la regeneración del tejido tarda mucho más tiempo y no se alcanza una recuperación funcional completa, debido a que la unión de los dos muñones a través del tejido puente generado por los fibroblastos y las células de Schwann (Dun et al., 2019), provoca que muchos de los axones regenerados no vuelvan a contactar con sus tejidos dianas originales. Como resultado de la lesión, en las células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes (de los haces de Remak), se produce una rápida activación de la expresión de *c-Jun*, lo que provoca su transdiferenciación hacia la célula de Schwann de reparación, o también llamada célula de Bungner (debido a que forman las *Bungner's bands*). Estas células son fundamentales en la *degeneración Walleriana* que finalmente va a permitir la regeneración axonal (Arthur-Farraj et al., 2012; Gomez-Sanchez et al., 2017; Jessen and Mirsky, 2016; Jessen et al., 2015b).

El proceso de reprogramación a célula de reparación está gobernado por el factor de transcripción *c-Jun*, el cual se empieza a expresar en niveles altos al poco de producirse la lesión. *c-Jun* inhibe la expresión de *Krox20* provocando la detención de la síntesis de los componentes de la mielina (Arthur-Farraj et al., 2012; Jessen and Mirsky, 2008; Parkinson et al., 2008). A continuación *c-Jun* induce la expresión de factores neurotróficos (*Artemina*, *Bdnf*, *Gdnf*, *Ngf* y *Shh*) los cuales favorecen la supervivencia neuronal y el crecimiento axonal (Arthur-Farraj et al., 2012; Fontana et al., 2012). *c-Jun* también induce la expresión de citoquinas (*il1- $\alpha$* , *il1- $\beta$* , *Mcp-1*, *Tnf- $\alpha$* ) que van a reclutar macrófagos que ayudan a eliminar los restos de mielina y de tejido dañado (*myelin clearance*) (Arthur-Farraj et al., 2012; Jessen and Mirsky, 2016). Por otra parte *c-Jun* activa también la mielinofagia en las células de Schwann, contribuyendo en la eliminación de la mielina (Arthur-Farraj et al., 2012; Gomez-Sanchez et al., 2015). Por último *c-Jun* favorece la correcta formación de las bandas de Bungner por donde van a crecer los axones hasta alcanzar sus tejidos dianas (Arthur-Farraj et al., 2012; Gomez-Sanchez et al., 2017; Jessen and Mirsky, 2016). Existen otros factores de transcripción, como son *Notch*, *Runx2* y *Sox-2*, que se activan en las células de Schwann después de producirse la lesión y participan junto a *c-Jun* (aunque de una manera todavía poco conocida) en la regulación de la regeneración nerviosa (Arthur-Farraj et al., 2017; Ding et al., 2018; Hung et al., 2015; Jessen and Arthur-Farraj, 2019).

Al regenerar, los axones vuelven a contactar los tejidos diana y con las células de Schwann de las bandas de Bugner. Esto provoca la reactivación del programa genético de la mielinización, desarrollándose la re-mielinización axonal, un proceso semejante pero no idéntico a la mielinización axonal que ocurre durante el desarrollo (Glenn and Talbot, 2013b; Sock and Wegner, 2019). Para que se produzca la transición de la célula de Schwann de reparación a célula de Schwann mielinizante se debe de detener la expresión de los reguladores negativos de la mielinización (principalmente *c-Jun*, pero también *Notch*, *Runx2* y *Sox-2*) que se encuentran inhibiendo la expresión de *Krox20* (Fazal et al., 2017; Parkinson et al., 2008; Roberts et al., 2017; Woodhoo et al., 2009; Wu et al., 2016).

A pesar de la capacidad para regenerarse del sistema nervioso periférico después de producirse una lesión, el nervio regenerado resultante no es del todo perfecto. El grosor de la vaina de mielina es más fino (Schroder, 1972), la longitud de la célula de Schwann mielinizante (distancia internodal) es menor y en consecuencia hay un mayor número de nodos de Ranvier (Gomez-Sanchez et al., 2017) que en un nervio periférico no lesionado.

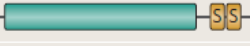
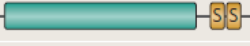

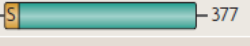
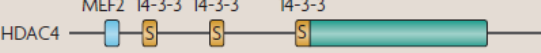

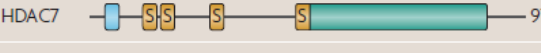
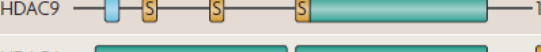

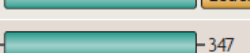
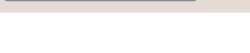
#### 4. Regulación epigenética de la mielinización.

El control de la expresión de los distintos programas genéticos durante el desarrollo embrionario y en los diferentes tipos celulares es realizado a través de los cambios en la accesibilidad al DNA de diferentes factores de transcripción. Uno de los mayores factores que controlan la estructura de la cromatina (y por lo tanto la accesibilidad al DNA) son las diferentes modificaciones post-transcripcionales en las colas de las histonas, las cuales impactan notablemente en la estructura del nucleosoma. Existe una gran diversidad de modificaciones post-transcripcionales en las histonas, las más estudiadas en el caso de las células de Schwann son las metilaciones y las acetilaciones (Duman et al., 2020). La acetilación de los residuos de lisina en las histonas neutraliza su carga positiva produciendo una relajación de los nucleosomas. Esto aumenta la accesibilidad al DNA de la maquinaria transcripcional. Además, las histonas acetiladas actúan de puntos de unión para los bromodominios de muchas proteínas que actúan de activadores transcripcionales. Por el contrario, la desacetilación de las histonas produce una condensación de los nucleosomas y bloquea la accesibilidad transcripcional. La acetilación de las histonas (que es un proceso reversible) es llevado a cabo por una familia de proteínas llamadas histona acetiltransferasas (HATs), mientras que la desacetilación la realizan las histonas desacetilasas (HDACs) (Duman et al., 2020).

Las histonas desacetilasas son una familia de proteínas muy extensa (Khochbin and Wolffe, 1997). En mamíferos hay 11 proteínas diferentes de esta familia. Todas ellas presentan una alta conservación del dominio desacetilasa, el cual necesita de un átomo de  $Zn^{2+}$  para realizar su actividad catalítica. Las histonas desacetilasas de mamíferos se clasifican en 4 grandes grupos o clases (ver Figura 3). La existencia de tantas isoformas diferentes de HDACs en las células eucariotas, junto a los resultados obtenidos a través de la generación de ratones *knockouts*, indica la existencia de especializaciones y redundancias funcionales. Las HDACs carecen de dominios de unión a ácidos nucleicos, por lo que su capacidad de unirse al DNA

depende de su interacción con diferentes factores de transcripción formando parte generalmente de complejos multiproteicos (Haberland et al., 2009).

La clasificación de las 11 HDACs de los mamíferos en 4 diferentes clases se ha realizado en función de su estructura, actividad enzimática, localización subcelular y patrón de expresión (Figura 3). Dentro de esta clasificación (revisado en (Haberland et al., 2009)) se han excluido a las sirtuinas, o también llamadas HDACs de la clase III, debido a que su actividad desacetilasa no depende de  $Zn^{2+}$ . Se ha determinado que la actividad desacetilasa de las sirtuinas depende de  $NAD^+$  (revisado en (Schwer and Verdin, 2008)).

	Protein domains	Time of lethality	Phenotype
Class I	HDAC1  482	E10.5	Proliferation defects
	HDAC2  488	P1	Cardiac malformation
	HDAC3  428	E9.5	Gastrulation defects
	HDAC8  377	P1	Craniofacial defects
Class IIa	HDAC4  1,084	P7-P14	Chondrocyte differentiation defect in growth plate
	HDAC5  1,122	Viable	Exacerbated cardiac hypertrophy after stress
	HDAC7  912	E11	Endothelial dysfunction
	HDAC9  1,069	Viable	Exacerbated cardiac hypertrophy after stress
Class IIb	HDAC6  1,215	Viable	Increased tubulin acetylation
	HDAC10  669	ND	–
Class IV	HDAC11  347	ND	–

**Figura 3. La superfamilia de las Histonas Desacetilasas (HDACs).** Esquema mostrando los diferentes dominios de las proteínas y fenotipos producidos por la pérdida de función en ratones *knockouts*. Los rectángulos verdes indican el dominio HDAC conservado, los números después del dominio HDAC indica el número de aminoácidos. Los sitios de unión al factor potenciador de miocitos 2 (MEF2) son representados por un cuadrado azul. También se muestran los sitios de unión para la proteína chaperona 14-3-3. E, día embrionario; ND, no determinado; P, días postnatales; S, sitios de fosforilación de serina; ZnF, dedo de zinc (Haberland et al., 2009).

La clase I de las HDACs está compuesto por las HDAC 1, 2, 3 y 8 que presentan una elevada homología con la HDAC de las levaduras, Rpd3. Estas HDACs se expresan de forma ubicua en todas las células de los mamíferos, y se localizan predominantemente dentro de los núcleos celulares. Todas ellas presentan una elevada actividad desacetilasa (Haberland et al., 2009). Las HDAC1 y HDAC2 tienen una elevada homología y se compensan entre ellas cuando se elimina una de ellas en las células de Schwann (Duman et al., 2020; Lu et al., 2019). La eliminación simultánea de ambas durante el desarrollo temprano detiene la formación de las células de Schwann precursoras a partir de las células de la cresta neural (Jacob, 2015; Jacob et al., 2014). También son fundamentales durante el desarrollo postnatal. La eliminación simultánea de ambas impacta de manera muy negativa en el desarrollo y el mantenimiento de la mielina en el sistema nervioso periférico. La HDAC1 controla la supervivencia de las células de Schwann regulando los niveles de  $\beta$ -catenina activa y la HDAC2 activa el programa transcripcional de la mielinización en sinergia con

Sox10 (Jacob et al., 2011). Además, ambas son necesarias para regular el correcto grado de acetilación de NF-kB, y así regular la activación del programa de mielinización (Chen et al., 2011). La HDAC2 al actuar sobre Sox10 regula la expresión de *Oct-6* y *Krox20*. Se ha visto que la eliminación de la HDAC1/2 bloquea la actividad transcripcional de Sox10, provocando una reducción de los niveles de *Oct-6* y *Krox20* en las células de Schwann, permitiendo un incremento de la respuesta al daño. Al haber menos expresión de *Krox20* las células de Schwann se reprograman antes en células de Bungner después de producirse una lesión, facilitando la regeneración axonal. A su vez la eliminación de la HDAC1/2 impide la re-mielinización al no poder activarse la expresión de *Krox20* (Brugger et al., 2017). La HDAC3 también parece participar en la regulación de la mielinización del sistema nervioso periférico (Duman et al., 2020; Lu et al., 2019). Sin embargo, hay que destacar que, hasta el momento, los pocos resultados publicados sobre su papel en la mielinización son en gran medida contradictorios. El grupo de Dr. Richard Lu obtuvo resultados que sugieren que la eliminación de la HDAC3 en las células de Schwann incrementa el grosor de la mielina, la regeneración y la recuperación funcional después del daño, concluyendo que la HDAC3 es un inhibidor de la mielinización (He et al., 2018). Por el contrario, el grupo de la Dra. Alison Lloyd descubrió que la eliminación de la HDAC3 afectaba exclusivamente al proceso de estabilización de la mielina una vez formada, no viéndose afectado al proceso de formación de la mielina (Rosenberg et al., 2018). Son pues necesarios más experimentos para tener una imagen más clara y concreta de cuál es el papel de la HDAC3 en la biología de la célula de Schwann y la mielinización del sistema nervioso periférico.

La HDACs de clase IIa lo conforman la HDAC 4, 5, 7 y 9. En contraste a las HDACs de la clase I, estas HDACs presentan un patrón de expresión mucho más restringido. La HDAC5 y la HDAC9 se expresan en el músculo, la HDAC4 se expresa en el cerebro y en las placas de crecimiento del esqueleto, y la HDAC7 se expresa en el tejido endotelial y los timocitos. Todas estas HDACs presentan una larga extensión del extremo N-terminal con dominios de unión a MEF2 y a la proteína 14-3-3. Además, estas HDACs están entrando y saliendo constantemente del núcleo de la célula y su localización celular depende de su estado de fosforilación. A través de la fosforilación de tres residuos de serinas (246, 467 y 632 en la HDAC4 humana) por parte de quinasas como las CaMK y PKD, estas HDACs salen del núcleo de la célula y se unen a la proteína 14-3-3 quedando retenidas en el citoplasma (Haberland et al., 2009). Mientras que la fosforilación de dos residuos de serina (265 y 266 en la HDAC4 humana) por parte de la PKA provoca su liberación de la proteína 14-3-3 y la translocación nuclear (Liu and Schneider, 2013). Y lo más importante, carecen de actividad desacetilasa debido a que presentan una mutación en el centro catalítico que cambia un residuo de tirosina por una histidina (His976Tyr en el caso de la HDAC4 humana) (Lahm et al., 2007). Por ello, estas HDACs para actuar de represores epigenéticos necesitan reclutar a la HDAC3 a través de la formación de un complejo macromolecular con NCoR1/SMRT (Fischer et al., 2002).

La clase IIb de las HDACs está compuesto por las HDAC 6 y 10. La HDAC6 es la mayor desacetilasa citoplasmática de las células de los mamíferos mientras que poco se conoce de las funciones de la HDAC10. Por último, a la clase IV de las HDACs pertenece exclusivamente la HDAC11, se expresa en el cerebro, corazón,

musculo, riñones y testículos, pero se desconoce cuáles son sus funciones ([Haberland et al., 2009](#)).

**OBJETIVO**

**Control de la expresión de c-Jun en las células de Schwann durante el proceso de diferenciación postnatal y de reprogramación en célula de Bugner inducida por la lesión nerviosa.** El principal punto de control en el proceso de diferenciación y reprogramación de las células de Schwann depende de la expresión del factor de transcripción c-Jun. Si bien en los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de los mecanismos que el factor de transcripción c-Jun utiliza para controlar el fenotipo de las células de Schwann, sorprendentemente se ha prestado poca atención en determinar como se regula su expresión en las células de Schwann.

## MATERIALES &amp; MÉTODOS

## 1. Animales.

Todo el trabajo que se ha realizado con ratones y ratas se ha llevado a cabo según las directrices de la UE y con los protocolos aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad del Instituto de Neurociencias de Alicante UMH-CSIC (UMH-IN-HCM-01-16).

Líneas transgénicas:

**P0Cre:** ratón Tg(Mpz-cre)<sup>26Mes</sup> (*P0-Cre<sup>+/-</sup>*) generado y cedido por el Dr. L. Wrabetz y el Dr. L. Feltri (Feltri et al., 1999). Es una línea de ratones transgénicos que expresan la enzima Cre recombinasa controlada por el promotor de la MPZ. La recombinación mediada por esta línea de ratones transgénicos se produce específicamente en las células de Schwann entre los días E13.5 y E14.5 del desarrollo embrionario. Aunque la actividad Cre más fuerte es detectada solo en los nervios periféricos, sin embargo, se observa una actividad mínima en el lóbulo occipital de la corteza cerebral, la capa de células de Purkinje del cerebelo y en el corazón. El fondo genético es *C57BL/6J*.

**HDAC4 FloxP:** ratón Hdac4tm2.1Eno (*HDAC4<sup>flox/flox</sup>*) generado y cedido por el profesor Eric N. Olson (Potthoff et al., 2007). Es una línea de ratones *knock in* para la HDAC4, tienen flanqueado el exón 6 con sitios loxP. Este ratón se cruzó con el ratón P0Cre para generar una línea de ratones *cKO\_4* (*P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flox/flox</sup>*) (Figura 11.F). El fondo genético es *C57BL/6JxCD129*.

**HDAC5 KO:** ratón Hdac5tm1Eno (*HDAC5<sup>-/-</sup>*) generado y cedido por el profesor Eric N. Olson (Chang et al., 2004) es una línea de ratones *knockout* para la HDAC5. El fondo genético es *C57BL/6J* (Figura 11.G).

**HDAC7 FloxP:** ratón Hdac7tm2Eno (*HDAC7<sup>flox/flox</sup>*) generado y cedido por el profesor Eric N. Olson (Chang et al., 2006) es una línea de ratones *knock in* para la HDAC7. Tienen flanqueado del exón 6 al 10 con sitios loxP. Este ratón se cruzó con el ratón P0Cre para generar una línea de ratones *cKO\_7* (*P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC7<sup>flox/flox</sup>*) (Figura 11.H). El fondo genético es *C57BL/6J*.

Primers:

Ratón	Secuencia (5' → 3')	
<i>P0Cre</i>	<i>Forward</i>	CCA CCA CCT CTC TCC ATT GCA C
	<i>Reverse</i>	GCT GGC CCA AAT GTT GCT GG
	Banda	490 bp
<i>HDAC4 FloxP</i>	<i>Forward</i>	ATC TGC CCA CCA GAG TAT GTG
	<i>Reverse</i>	CTT GTT GAG AAC AAA CTC CTG CAG CT



	<i>Recombined</i>	CTC CAA TTC TCC ACA AGA CAG C
	Bandas	WT 480 bp, FloxP 620 bp y Recombinación 250 bp
<i>HDAC5 KO</i>	<i>Forward</i>	CAA GGC CTT GTG CAT GCT GGG CTG G
	<i>Reverse</i>	CTG CTC CCG TAG CGC AGG GTC CAT G
	<i>LacZ</i>	GCC CGT TTG AGG GGA CGA CGA CAG TAT TCG
	Bandas	WT 250 bp y KO 500 bp
<i>HDAC7 FloxP</i>	<i>Forward</i>	GTT GCA GGG TCA GCA GCG CAG GCT CTG
	<i>Reverse</i>	CCA GTG GAC GAG CAT TCT GGA GAA AGG
	Bandas	WT 400 bp y FloxP 430 bp

Reactivos:

**Reactivo A:** 25 mM NaOH pH 12 (*J.T.Baker, 0402*), 0,2 mM EDTA (*Panreac, 1316691209*).

**Reactivo B:** 40 mM Tris-HCl pH 5 (*Sigma-Aldrich, T1503*).

Genotipado:

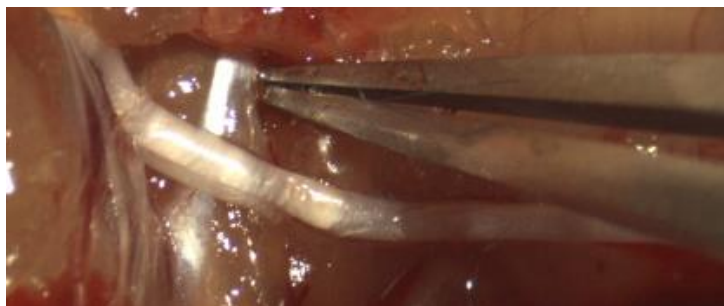
Cuando destetamos a los ratones (a P20) se les cortó un pequeño trozo de la cola para el genotipado, el cual se digirió durante 30 minutos a 95°C en 100 µl del Reactivo A, después se añadió 100 µl del reactivo B para neutralizar la digestión, se mezcló bien empleando el vortex y centrifugamos 5 minutos a 13.000 rpm (*Thermo Electron Corporation, IEC microCL 17*). Para la PCR seguimos el protocolo descrito de KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit dye (*KAPA Biosystems, 07961278001*). Las reacciones de PCR se realizaron dentro de un eppendorf de 0,2 ml (*Axygen, PCR-02-C*) usando un Mastercycler Thermocycler Personal (*Eppendorf, 5332*), 10 µl del producto de PCR se corrió en un gel de electroforesis de agarosa al 1% (*Sigma-Aldric, A9539*) que contenía bromuro de etidio. Las muestras corrieron junto a 5 µl de DNA Ladder (*Nippon Genetiks, B4MWD100*).

**2. Lesión del nervio ciático *in vivo*.**

Cirugías:

Para los experimentos de *crush* y las axotomizaciones del nervio ciático se ha trabajado con ratones con 8 semanas, los cuales fueron anestesiados profundamente con 5% isoflurano (*Zoetis, IsoFlo*) antes de iniciar las cirugías. Después se mantuvieron durante todo el proceso de la cirugía anestesiados con 2,5 % isoflurano. Para exponer el nervio ciático, lo primero que hicimos fue depilar la pierna derecha del ratón empleando una maquina corta pelo de uso veterinario. Después de colocar al ratón en posición *decúbito prono*, se realizó un corte de la piel empleando unas tijeras (*Fine Science Tools, 16144-13*) y se desgarró el músculo empleando dos fórceps (*Fine Science Tools, 91197-00*). Para las cirugías de *crush*, después de exponer el nervio ciático fue presionado con unas pinzas (*Fine Science Tools, 11049-10*) durante 15 segundos (3 veces) encima del tendón (ver la [Figura 4](#)), mientras que para las cirugías

de axotomizaciones fue cortado por encima del tendón empleado unas tijeras (*Fine Science Tools, 91500-09*). Por último, la piel fue cerrada empleando una grapa estéril (*F.S.T., 12022-09*), y se les inyectó vía intraperitoneal 0,05 mg/kg buprenorfina (*DEV, Buprecare*) diluida en solución salina 0,9 mg/ml de NaCl (*Laboratorios Serra Prime, 826909*).



**Figura 4.** La punta de la pinza señala el tendón sobre el que se realiza el *crush* o el *cut*.

### Extracción de los nervios ciáticos:

A diferentes tiempos después de las lesiones, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. A continuación, el nervio ciático lesionado (pierna derecha) y no lesionado (pierna izquierda) fueron expuestos y extraídos. Para ello, el ratón fue colocado en posición *decúbito prono* y mediante el empleo de diferentes tijeras se cortó la piel (*Fine Science Tools, 14101-14*), el músculo (*Fine Science Tools, 16144-13*) y los nervios ciáticos (*Fine Science Tools, 91500-09*), por encima del tendón, en el caso de las lesiones por *crush*, y en la ramificación tibial de la rodilla. Por último, el nervio fue extraído pinzando el extremo de la rodilla con unas pinzas (*Fine Science Tools, 91150-20*). Para la microscopía electrónica de transmisión, antes de extraer los nervios se fijaron durante 15 minutos dentro del ratón empleando una solución de fijación [2 % PFA (*Electron Microscopy Sciences, 15710*) y 2,5 % glutaraldehído (*Electron Microscopy Sciences, 16220*) en 0,1 M cacodilato buffer pH 7.4 (*Electron Microscopy Sciences, 12300*)]. Para los *Western blot*, de los nervios no lesionados guardamos, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , 1 cm desde el tendón y de los nervios lesionados los primeros 8 mm del muñón distal. Para qPCR, de los nervios no lesionados guardamos, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , la mayor cantidad del nervio posible, desde la columna hasta el pie, y de los nervios lesionados los primeros 8 mm del muñón distal.

### **3. Microscopía electrónica de transmisión.**

#### Reactivos:

**Azul de Toluidina:** 50 mM Tetraborato Sódico (*Sigma-Aldrich, 221732*), 16 mM Azul de Toluidina (*Sigma-Aldrich, T3260-25G*).

**Resina:** 12 g Agar 100 Resin (*Agar Scientific, R1043*), 8 g Dodecyl Succinic Anhidride (*Agar Scientific, R1051*), 5 g Methyl Nadic Anhidride (*Agar Scientific, R1082*), 16 gotas Benzylidemethylamine (*Agar Scientific, R1062*).

**Solución de fijación:** 2 % PFA (*Electron Microscopy Sciences, 15710*) y 2,5 % Glutaraldehído (*Electron Microscopy Sciences, 16220*) en 0,1 M Cacodilato Buffer pH 7.4 (*Electron Microscopy Sciences, 12300*).

### Protocolo:

Los nervios después de ser extraídos se incubaron a 4°C en solución de fijación dentro de un *bijou* (*Thermo Scientific, 216-0979/11369123*) de 1 a 7 días. Luego se lavaron 3 veces en tampón cacodilato 0,1 M pH 7.4 durante 15 minutos en agitación (*Heidolph, Polymax 1040*) a TA y se osmificaron al incubarse durante 90 minutos a 4°C en 1 % tetraóxido de osmio (*Electron Microscopy Sciences, 19150*), en tampón cacodilato 0,1 M pH 7.4. Después se lavaron 2 veces más en H<sub>2</sub>O Mill Q durante 15 minutos en agitación a TA. Las muestras se deshidrataron realizando incubaciones en serie de etanol (*AppliChem, 131086.1211*) de manera gradual en agitación a TA (1x 25 % 5 minutos, 1x 50 % 5 minutos, 1x 75 % 5 minutos, 1x 90 % 10 minutos y 4x 100 % 10 minutos), a continuación, se realizaron 3 incubaciones con óxido de propileno (*Electron Microscopy Sciences, 20401*) durante 10 minutos en agitación a TA. Por último, se incubó durante 1 hora en agitación a TA con una mezcla (50:50) de óxido de propileno y resina, seguido de otra incubación durante 2 horas en agitación a TA con una mezcla (25:75) de óxido de propileno y resina, además, se dejó incubando durante la noche en agitación a TA en la resina. Al día siguiente, se volvió a incubarse durante 2 horas en agitación a TA en resina recién preparada. Después los nervios se cortaron con una hoja de bisturí N°10 (*Nahita, 900437205100*) a una distancia de 5,5 mm del extremo de la lesión (el tendón) y las dos piezas resultado del corte se introdujeron dentro de los moldes de silicona (*Electron Microscopy Sciences, 70902*) con resina. Finalmente, se incubaron durante 24 horas a 60°C. Los nervios se cortaron a 5,5 mm desde la zona de la lesión para poder desbastar sin problemas los primeros 450 µm realizando cortes de 2 a 6 µm mediante un ultramicrotomo (*Leica, EM UC7*) con cuchillas de cristal. A 5 mm de la zona de lesión se realizaron varios cortes semifinos a 2 µm y se tiñeron con azul de toluidina para comprobar la calidad de los tejidos antes de proceder a la realización de los estudios de microscopía electrónica de transmisión. Una vez comprobada la calidad de las muestras, los cortes ultrafinos se realizaron de 70 a 90 nm mediante un ultramicrotomo (*Leica, Reichert Ultracut E*) y se recogieron sobre *Agar Grids 2x1mm Slot Copper 3.05mm* (*Agar Scientific, AGG2500C*). La tinción se realizó en gotas de acetato de uranilo acuoso al 1 %, seguido de citrato de plomo (*Reynolds*). Los análisis ultraestructurales se realizaron en un microscopio electrónico (*Jeol, 1010*) utilizando el software *Gatan*. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el software *Fiji-win64 (ImageJ)*, la cuantificación del *g-ratio* de las vainas de mielina se realizó transformando las fotografías de TEM en una imagen binomial, empleando un ajuste del *threshold (default)*. Después, medimos el perímetro de los axones y de las vainas de mielina.

### **4. Técnicas de cultivo.**

#### Medios:

## MATERIALES & MÉTODOS

**Medio de expansión de SC:** DMEM GlutaMAX (4,5 g/l glucosa) (Gibco, 11574516) suplementado con: 100 U/ml Penicilina/Estreptomicina (Gibco, 11548876), 3 % FBS (Fisher, 11550356), 5  $\mu$ M Foskolina (Sigma-Aldrich, F6886), 10 ng/ml rNRG1 (R&D Systems, RYD-396-HB-050).

**Medio HEK293:** DMEM GlutaMAX (4,5 g/l glucosa) (Gibco, 11574516) suplementado con: 100 U/ml Penicilina/Estreptomicina (Gibco, 11548876) y 10 % FBS (Fisher, 11550356).

**Medio RT4D6:** DMEM GlutaMAX (4,5 g/l glucose) (Gibco, 11574516) suplementado con: 100 U/ml Penicilina/Estreptomicina (Gibco, 11548876) y 5 % FBS (Fisher, 11550356).

**Medio SATO:** DMEM Ham's F12 (Gibco, 11520396) suplementado con: 100 U/ml Penicilina/Estreptomicina (Gibco, 11548876), 1:100 Insulin-Transferrin-Selenium (Gibco, 41400-045), 0.1 mM Putrescine (Sigma-Aldrich, P5780), 20 nM Progesterona (Sigma-Aldrich, P0130) [Tomado de (Bottenstein and Sato, 1979)].

### Reactivos:

**100 mM dbcAMP** (Sigma-Aldrich, D0627), también denominado *dibutilil cAMP* o *N<sup>6</sup>,2'-O-Dibutyryl adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate Sodium*.

**20 mM Forscolina** (Sigma-Aldrich, F6886).

### Preparación de frascos T-75, placas de cultivo y coverslips para sembrar las SC:

Todos los procesos se han realizado bajo condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II (*Telstar, Cytostar*). Los frascos T-75 (*Falcon, 453531136*) y las placas de cultivo de 10 cm<sup>2</sup> (*Falcon, 3453003*) y de 35 mm<sup>2</sup> (*Falcon, 353001*) se incubaron durante 20 minutos a TA con una película de poli-L-lisina (PLL) 0,01% (*Sigma-Aldrich, P4707-50ML*), después se retiró la PLL y se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O antes de sembrar las SC. Los *coverslips* de cristal para microscopía de 12 mm<sup>2</sup> (*VWR, ECN 631-1577*), se introdujeron dentro de cada uno de los pocillos de una placa de 12 pocillos (*Falcon, 353043*), se incubaron durante 1 hora a TA con 150  $\mu$ l de PLL sobre ellos, después se retiró la PLL y se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O, se dejaron secar bien los cristales durante 1 hora y se volvieron a incubar 30 minutos a TA con 100  $\mu$ l de laminina (*Sigma-Aldrich, L2020*) 20  $\mu$ g/ml diluida en DMEM GlutaMAX (4,5 g/l glucose) (Gibco, 11574516) sobre ellos, al final se retiró la laminina y se sembraron las SC.

### Cultivo de células de Schwann de rata:

Todos los procesos se realizaron bajo condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II (*Telstar, Cytostar*). Se utilizó crías de rata *Wistar*

P2-P4 que fueron sacrificadas mediante decapitación usando unas tijeras (*Fine Science Tools, 16144-13*). La extracción de los nervios ciáticos y la limpieza se realizó utilizando una lupa binocular (*Leica, S6D*). Cada rata se colocó en posición *decúbito prono* sobre la superficie de disección, después, la piel, el músculo y el hueso de la cadera fue cortado empleando unas tijeras (*Fine Science Tools, 16144-13*). Por último, se extrajo el nervio ciático desde su salida del ganglio raquídeo hasta el pie, pinzándolo por el extremo del ganglio raquídeo con unas pinzas (*Fine Science Tools, 91150-20*). Los ciáticos se fueron depositando dentro de unas placas de cultivo de 35 mm<sup>2</sup> (*Falcon, 353001*) que contenían 2 ml de medio *L-15* (*Gibco, 11570396*), colocadas sobre hielo. Después se procedió a limpiar los nervios empleando dos pinzas (*Fine Science Tools, 91150-20*), eliminando el tejido adiposo unido a los nervios, así como la capa de epineuro que los envuelve. Una vez limpios, los transferimos a una nueva placa de cultivo de 35 mm<sup>2</sup> que contenía *DMEM GlutaMAX* (4,5 g/l glucosa) (*Gibco, 11574516*) con 1 mg/ml de colágenasa A (*Roche 10103586001*), posteriormente fueron cortados con una hoja de bisturí nº10 (*Nahita, 900437205100*) y se dejaron en el incubador, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, durante 2 horas y media. Mientras tanto preparamos las placas de cultivo de 35 mm<sup>2</sup> (*Falcon, 353001*) para poder sembrar las SC (una placa de cultivo por cada 2 crías de rata utilizadas). Después de las 2 horas y media de incubación con la colágenasa A, la digestión se detuvo añadiendo 2 ml de medio *HEK293* para detener la reacción de digestión. Separamos las SC del resto del tejido no digerido haciendo pasar los 4 ml de la digestión por un separador celular (*Falcon, 9049638*) recogiéndolas dentro de un falcón de 50 ml (*Falcon, 430829*). A continuación, se centrifugó (*Eppendorf, 5804R*) el homogeneizado celular a 210 g durante 10 minutos a TA, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio *HEK293* suplementado con 1 µM de citosina-β-D-arabinofuranósido (*AraC*) (*Sigma-Aldrich, C6645*), un antimetabólico, para prevenir el crecimiento de los fibroblastos. Las células resuspendidas se sembraron en las placas de cultivo de 35 mm<sup>2</sup> recubiertas con PLL. Después de 72 horas, se retiró el medio, se lavaron una vez con *DMEM GlutaMAX* (4,5 g/l glucosa) (*Gibco, 11574516*) y se añadió medio de expansión para promover la división celular de las SC. Después de aproximadamente 96 horas, las SC se encontraban confluentes y listas para trabajar con ellas.

### HEK293 y HEK293T:

Todos los trabajos se realizaron bajo condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II (*Telstar, Cytostar*), las células *HEK293* (*Sigma-Aldrich, 85120602*) y *HEK293T* (*Sigma-Aldrich, 12022001*) fueron crecidas en frascos T-75 (*Falcon, 453531136*) no tratados con PLL y empleando medio *HEK293*.

### Schwannoma RT4D6:

Las células de Schwannoma de rata (*RT4D6-P2T*) fueron cedidas por el profesor Dies Meijer del *Centre for Neuroregeneration at the University of Edinburgh*. Todos los trabajos se realizaron bajo condiciones de esterilidad dentro de una cabina de

seguridad biológica tipo II (*Telstar*, *Cytostar*), las células fueron crecidas en frascos T-75 (*Falcon*, 453531136) no tratados con PLL y empleando medio *RT4D6*.

### 5. Transfecciones.

Plásmidos:

***pEGFP-N1***: obtenido de laboratorios *Clontech*.

***phHDAC4-GFP***: fue proporcionado por el profesor Claudio Brancolini, del *Department of Medical and Biological Sciences at the University of Udine* ([Paroni et al., 2004](#)).

***phHDAC4-S265/266A-GFP***: fue generado en nuestro laboratorio por mutagénesis dirigida siguiendo el protocolo descrito de *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene*, 200519). El plásmido de la HDAC4-GFP fue amplificado por PCR utilizando los *primers* 5'- GCC GAA AGA CGG GCC GCC CCC CTG TTA CGC -3' (forward) y 5'- GCG TAA CAG GGG GGC GGC CCG TCT TTC GGC -3' (reverse).

***phHDAC4-3SA-GFP***: fue proporcionado por el profesor Claudio Brancolini, del *Department of Medical and Biological Sciences at the University of Udine* ([Paroni et al., 2008](#); [Paroni et al., 2007](#)).

***phHDAC4-3SA-L175A-GFP***: fue generado en nuestro laboratorio por mutagénesis dirigida siguiendo el protocolo descrito de *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene*, 200519). El plásmido de la HDAC4-3SA-GFP fue amplificado por PCR utilizando los *primers* 5'- GAA GTG AAG ATG AAG GCA CAA GAA TTT GTC CTC -3' (forward) y 5'- GAG GAC AAA TTC TTG TGC CTT CAT CTT CAC TTC -3' (reverse).

***phHDAC4-3SA-V179A-GFP***: fue generado en nuestro laboratorio por mutagénesis dirigida siguiendo el protocolo descrito de *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene*, 200519). El plásmido de la HDAC4-3SA-GFP fue amplificado por PCR utilizando los *primers* 5'- GTT ACA AGA ATT TGC CCT CAA TAA AAA GAA GG -3' (forward) y 5'- CCT TCT TTT TAT TGA GGG CAA ATT CTT GTA AC -3' (reverse).

***phHDAC4-3SA-H803A-GFP***: fue generado en nuestro laboratorio por mutagénesis dirigida siguiendo el protocolo descrito de *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene*, 200519). El plásmido de la HDAC4-3SA-GFP fue amplificado por PCR utilizando los *primers* 5'- CCC CCT GGA CAC GCT GCG GAG GA -3' (forward) y 5'- GCT CTC CTC CGC AGC GTG TCC AG -3' (reverse).

***pRC/RSV*** (vacío): fue proporcionado por el Dr. Ángel Barco.

***pRC/RSV-PKA***: fue proporcionado por el Dr. Ángel Barco.

### Transformación de *Escherichia coli*:

*Escherichia coli* DH<sub>5</sub>- $\alpha$  competentes fueron transformadas con el producto de la PCR de la mutagénesis. Se trabajó en condiciones de esterilidad delante de un mechero Bunsen. Descongelamos una alícuota de *E. coli* competentes y le añadimos 10  $\mu$ l del producto de la PCR, con cuidado mediante unos golpes con el dedo homogenizamos la mezcla, después se incubó durante 20 minutos en hielo, seguidamente las sumergimos en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos y volvimos a incubar durante 2 minutos en hielo. Añadimos 500  $\mu$ l de medio LB (*Sigma-Aldrich*, L3022) e incubamos durante 40 minutos a 37°C en un agitador orbital (*Thermo Scientific*, 866-9) y sembramos 200  $\mu$ l en una placa de LB agar (*Sigma-Aldrich*, L2897) con antibióticos, 100 ng/ml de ampicilina (*Sigma-Aldrich*, A9518) o 50 ng/ml de kanamicina (*Sigma-Aldrich*, K4000). Después de incubar durante 24 horas a 37°C fueron seleccionadas las CFU resistentes a los antibióticos traspasando parte de la biomasa a un tubo (*Sarstedt*, 62.515.006) con 5 ml de medio LB (*Sigma-Aldrich*, L3022) con antibióticos y se incubó durante 24 horas a 37°C en un agitador orbital (*Thermo Scientific*, 866-9). Después se extrajeron los plásmidos siguiendo el protocolo descrito de *NucleoSpin Plasmid EasyPure* (*Macherey-Nagel*, 740727.250), posteriormente las CFU con el constructo correcto fueron identificados mediante secuenciación de los plásmidos.

### Transfección de SC:

Todos los trabajos se realizaron bajo condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II (*Telstar*, *Cytostar*). Se sembraron 100.000 SC (en 100  $\mu$ l de medio de expansión de SC) sobre un *coverslip* de cristal para microscopía de 12 mm<sup>2</sup> (*VWR*, ECN 631-1577), a la hora se añadió con cuidado 400  $\mu$ l de medio de expansión de SC dentro del pocillo. A las 24 horas se realizó la transfección siguiendo el protocolo descrito de *LipoD293 DNA In Vitro Transfection Reagent* (*SignaGen Laboratories*, SL100668). A las 2 horas después de poner la transfección cambiamos el medio por 500  $\mu$ l de medio de expansión de SC.

### Transfección de RT4D6:

Todos los trabajos se realizaron bajo condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II (*Telstar*, *Cytostar*). Se sembraron 800.000 células RT4D6 (en 2 ml de medio de RT4D6) por pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos (*Falcon*, 353046). A las 24 horas se realizó la transfección siguiendo el protocolo descrito de *LipoD293 DNA In Vitro Transfection Reagent* (*SignaGen Laboratories*, SL100668). A las 4 horas después de poner la transfección cambiamos el medio por 2 ml de medio de RT4D6.

## 6. Infecciones.

### Adenovirus:

**Adenovirus GFP:** Cat.No. 000541A (*abm*), vector *pAdeno*, promotor *CMV*, inserto *GFP*, reportero *GFP*.

**Adenovirus HDAC4-3S/A-Flag:** Cat.No. 000547A (*abm*), vector *pAdeno*, promotor *CMV*, inserto *HDAC4 3S/A* (ratón), reportero *Flag*.

### Generación de adenovirus:

Todos los trabajos se realizaron bajo condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II (*Telstar, Cytostar*). Se sembraron  $5 \times 10^6$  *HEK293* en una placa de cultivo de  $10 \text{ cm}^2$  (*Falcon, 3453003*). A las 24 horas se añadió 1 ml de medio con adenovirus. La primera vez se añadió la alícuota del adenovirus GFP y HDAC4 3SA que se compraron (*abm*), las veces siguientes el medio con los Ad procedía de infecciones anteriores. Tras 72 horas más, cuando las células *HEK293* estaban despegadas se recogió el medio y se congeló, a  $-80^\circ\text{C}$ , durante 1 hora, para descongelarlo de nuevo a  $37^\circ\text{C}$  para romper las *HEK293* y liberar los adenovirus (este ciclo se repitió 4 veces). Al final, el medio se centrifugó 10 minutos a  $5.000 \text{ g}$  y el sobrenadante, con las partículas virales, fue alícuotado y guardado a  $-80^\circ\text{C}$ . El propio medio que se generó se empleó en las siguientes tandas de fabricación de los adenovirus.

### Lentivirus:

**Lv HDAC4 shRNA:** fue generado mediante tecnología *Gateway* siguiendo el protocolo descrito de *BLOK-iT Lentiviral RNAi Expression System* (*Invitrogen, K4944-00*). Como vector de entrada usamos el *pENTR/U6 HDAC4 shRNA* (*Addgene, 32220*), y como vector de destino el *pLenti CMV GFP DEST* (*Addgene, 19732*). La reacción de recombinación entre estos dos constructos se realizó empleando la *Gateway LR Clonase II* (*Invitrogen, 11791020*), después se transformó *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes y se seleccionó las CFU resistentes a ampicilina.  $15 \mu\text{g}$  del vector de expresión resultante se empleó para co-transfectar *HEK293T*, 24 horas antes se sembraron  $5 \times 10^6$  *HEK293T* en una placa de cultivo de  $10 \text{ cm}^2$  (*Falcon, 3453003*), en combinación con  $3 \mu\text{g}$  del vector *pVSV-G* y  $20 \mu\text{g}$  del vector *pCMV $\Delta$ 8.9* usando  $50 \mu\text{l}$  de *Lipofectamine 2000 Reagent* (*Invitrogen, 11668-019*) siguiendo el protocolo de la casa comercial. A las 48 horas de la co-transfección el medio de las *HEK293T* fue recogido, filtrado (*VWR, 514-0063*), alícuotado y guardado a  $-80^\circ\text{C}$ .

**Lv GFP:** fue generado de la misma manera, pero como vector de entrada se usó el *pENTR/U6* (*Addgene, 17387*).

### Infección de SC:

Todos los trabajos se realizaron bajo condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II (*Telstar, Cytostar*). Para realizar una inmunofluorescencia se sembraron 100.000 SC (en  $100 \mu\text{l}$  de medio de expansión de



SC) sobre un *coverslip* de cristal para microscopía de 12 mm<sup>2</sup> (VWR, ECN 631-1577), a la hora se añadió con cuidado 400 µl de medio de expansión de SC dentro del pocillo. A las 24 horas se eliminaron 200 µl de medio de expansión de SC y se reemplazó por 200 µl de medio con los virus. A las 24 horas después de añadir los virus cambiamos el medio por 500 µl de medio de expansión de SC. Para realizar un *Western blot* o una qPCR, sembramos 2x10<sup>6</sup> SC en una placa de cultivo de 10 cm<sup>2</sup> (Falcon, 3453003). Entre las 72 ó 96 horas de ser sembradas, cuando las SC se encontraban en una confluencia del 100 %, se cambió el medio por 5 ml de medio de expansión de SC y 2 ml de medio con los virus. A las 24 horas después de añadir los virus cambiamos el medio por 7 ml de medio de expansión de SC.

**7. Inmunofluorescencia.**

Anticuerpos primarios:

Anticuerpo	Referencia	Empresa	Especie	Dilución
c-Jun	9165	Cell Signalin	Rabbit	1:300
Flag M2	F1804	Sigma-Aldrich	Mouse	1:500
GFP	Ab13970	Abcam	Chicken	1:2.000
HDAC4	H0163	Sigma-Aldrich	Mouse	1:200
HDAC4	SC-11418X	Santa Cruz	Rabbit	1:200
KI67	Ab15580	Abcam	Rabbit	1:100
Krox20	AF1356A	Abgent	Goat	1:500
Periaxina	-	Dr. Peter Brophy	Rabbit	1:5.000
Sox10	AF2864	RD System	Goat	1:100

Anticuerpos secundarios:

Anticuerpo	Referencia	Empresa	Dilución
Alexa 488 Donkey anti-Chicken	703-545-155	Jackson ImmunoResearch	1:1.000
Alexa 488 Donkey anti-Rabbit	A21206	Molecular probes - Thermo Scientific	1:1.000
Alexa 488 Goat anti-Chicken	A11039	Molecular probes - Thermo Scientific	1:1.000
Alexa 488 Goat anti-Mouse	A11001	Molecular probes - Thermo Scientific	1:1.000
Alexa 546 Goat anti-Rabbit	A11010	Molecular probes - Thermo Scientific	1:1.000
Alexa 555 Donkey anti-Goat	A21432	Molecular probes - Thermo Scientific	1:1.000
Alexa 594 Goat anti-Mouse	A11005	Molecular probes - Thermo Scientific	1:1.000
Hoechst (1 mg/ml bisBenzimide)	H 33342	Sigma-Aldrich	1:1.000

### Reactivos:

**PFA 4 %** (*Sigma-Aldrich, P6148*) diluido en PBS 1x pH 7.4 (*Sigma-Aldrich, P4417-100TAB*).

**Solución de Bloqueo:** PBS 1x pH 7.4 (*Sigma-Aldrich, P4417-100TAB*), 5 % Suero de Caballo (*Gibco, 16050-130*), 0,1 % Triton-X100 (*Applichen, A1388,0500*).

### Inmunofluorescencia de SC de rata:

Primero se quitó el medio de los pocillos y se lavó durante 1 minuto con 500  $\mu$ l PBS 1x a TA, después, se añadió 300  $\mu$ l de PFA 4% y se incubó 10 minutos a TA. Se prosiguió haciendo 4 lavados de 1 minuto cada uno con PBS 1x a TA. Bloqueamos durante 1 hora a TA con 150  $\mu$ l de la solución de bloqueo y dejamos incubando toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en 100  $\mu$ l de la solución de bloqueo. Al día siguiente, lavamos los *coverslips* en PBS 1x, para ello empleamos 6 falcons de 50 ml (*Falcon, F430829*) llenos de PBS 1x en donde los sumergíamos 6 veces en cada uno, después, incubamos durante 2 horas a TA con los anticuerpos secundarios y el reactivo de *Hoechst* (tinción nuclear) diluidos en 100  $\mu$ l de la solución de bloqueo. Por último, volvíamos a lavar los *coverslips* en PBS 1x y los montamos sobre los portaobjetos (*Thermo Scientific, J1800AMNZ*) con una gota de *Fluoromount-G* (*Southern Biotech, 0100-01*).

### Adquisición de las imágenes y análisis de los datos:

Las fotos de las inmunofluorescencias de las SC se adquirieron mediante una cámara *Hamatsu-Photonics (CA742-80-12AG)* conectada a un microscopio de epifluorescencia *Nikon Eclipse (TE2000-S)* empleando un objetivo *60x/1.40 Oil  $\infty$ /0.17 DIC N2 (Nikon, Plan Apo VC)* y usando el *software Metamorph Microscopy Automation and Image Analysis Software*. Se tomaron fotos en escala de grises del mismo campo de SC en los canales verde, rojo y azul por separado. Posteriormente el montaje de la imagen y la adicción de los colores se realizaron empleando el *software Fiji-win64 (ImageJ)*. Para el análisis cuantitativo de la traslocación nuclear de la HDAC4 se utilizó el *software Metamorph Microscopy Automation and Image Analysis Software*. Para ello, clicamos en el centro del núcleo de las SC generándose una circunferencia (20x20 píxeles), dentro de la cual el *software Metamorph* nos cuantificaba la cantidad de píxeles que correspondía con la intensidad de fluorescencia dentro de la circunferencia, y este valor fue dividido por la señal de otra circunferencia localizado en el citoplasma de la misma SC. Para el análisis cuantitativo del nivel de expresión de una proteína nuclear (c-Jun, HDAC4 y Krox20) se utilizó el *software Metamorph Microscopy Automation and Image Analysis Software*. Para ello, clicamos en el centro del núcleo de las SC generándose una circunferencia (20x20 píxeles), dentro de la cual el *software Metamorph* nos cuantificaba la cantidad de píxeles que correspondía que, con la intensidad de fluorescencia dentro de la circunferencia, y a este valor le restábamos la señal de otra circunferencia localizada en el citoplasma de la misma SC, para eliminar el ruido de fondo de la inmunofluorescencia a la señal nuclear. Para

el análisis cuantitativo del nivel de expresión de una proteína citoplasmática (Periaxina) se utilizó el *software Metamorph Microscopy Automation and Image Analysis Software*. Para ello, clicamos en el citoplasma de las SC generándose una circunferencia (20x20 pixeles), dentro de la cual el *software Metamorph* nos cuantificaba la cantidad de pixeles que correspondía con la intensidad de fluorescencia dentro de la circunferencia, y a este valor le restábamos la señal de otra circunferencia localizada fuera de la misma SC, para eliminar el ruido de fondo de la inmunofluorescencia a la señal citoplasmática. Para cuantificar las áreas de los núcleos de las SC se utilizó el *software Fiji-win64 (ImageJ)*. Para ello, las fotos de los núcleos de las SC tomadas en el canal azul se transformaron en una imagen binomial, empleando un ajuste del threshold (default).

### Translocación de la HDAC4 in vivo en los nervios ciáticos de rata:

Ratas Wistar P4 fueron anestesiadas profundamente con 2,5 % isoflurano (*Zoetis, IsoFlo*), se colocaron en posición *decubito prono* y se expusieron los nervios ciáticos al cortar la piel y el músculo con unas tijeras (*Fine Science Tools, 16144-13*). Durante 1 hora se mantuvieron inmersos el nervio ciático izquierdo con solución salina 0,9 mg/ml de NaCl (*Laboratorios Serra Prime, 826909*) y el derecho con 1 mM dbcAMP diluido en solución salina 0,9 mg/ml de NaCl. Al final, las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación usando unas tijeras (*Fine Science Tools, 16144-13*), después, se extrajeron los nervios ciáticos, cortando con unas tijeras (*Fine Science Tools, 91500-09*) desde la salida del ganglio raquídeo hasta la ramificación tibial de la rodilla, pinzando por el extremo de la rodilla con unas pinzas (*Fine Science Tools, 91150-20*). Seguidamente, los nervios ciáticos se embebieron en OCT (*Tissue-Tek, 4583*) y se congelaron a -80°C dentro de unos moldes (*TAAB, E106*) llenos de OCT. Los moldes de OCT fueron cortados en secciones longitudinales de 10 µm de grosor con el criostato (*SLEE, MNT*). Los portaobjetos con los cortes se lavaron 5 minutos en PBS 1x a TA y en agitación suave (*Heidolph, Polymax 1040*), después se fijaron durante 10 minutos a TA con 300 µl PFA 4% en PBS 1x. Seguidamente se lavaron 3 veces con PBS 1x durante 5 minutos en agitación suave a TA y se dejaron incubando toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en 200 µl solución de bloqueo. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS 1x durante 5 minutos en agitación suave a TA y se volvieron a incubar durante 2 horas a TA con los anticuerpos secundarios y el *Hoechst* (tinción nuclear) todo diluidos en 200 µl solución de bloqueo. Por último, volvíamos a lavar 3 veces con PBS 1x durante 5 minutos en agitación suave a TA y se montaron los cubreobjetos con una gota de *Fluoromount-G (Southern Biotech, 0100-01)*. Las imágenes fueron tomadas mediante un confocal invertido (*Leica*) a 63x.

### **8. Co-inmunoprecipitaciones.**

#### Reactivos:

**CoIP Lysis Buffer:** 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (*Sigma-Aldrich, T1503*), 120 mM NaCl (*Sigma-Aldrich, S9888*), 0,5 mM EDTA (*Panreac, 1316691209*), 0,5 % Nonidet P-

## MATERIALES & MÉTODOS

40 (Roche, 1754599), con inhibidores proteasas (Sigma-Aldrich, 11836153001) y fosfatasas (Fisher Scientific, 15691759) al 1x.

**GFP-Trap A Buffer:** 10 mM Tris-HCl pH 7.5 (Sigma-Aldrich, T1503), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich, S9888), 0.5 mM EDTA (Panreac, 1316691209) con inhibidores proteasas (Sigma-Aldrich, 11836153001) y fosfatasas (Fisher Scientific, 15691759) al 1x.

**Sample Buffer 2x:** 120 mM Tris-HCl pH 6.8 (Sigma-Aldrich, T1503), 4 % SDS (Sigma-Aldrich, L3771), 20 % Glicerol (Sigma-Aldrich, G5516), 0,04 % Bromophenol Blue (Sigma-Aldrich, B-8026).

**Sample Buffer 5x:** 250 mM Tris-HCl pH 6.8 (Sigma-Aldrich, T1503), 10 % SDS (Sigma-Aldrich, L3771), 30 % Glicerol (Sigma-Aldrich, G5516), 0,05 % Bromophenol Blue (Sigma-Aldrich, B-8026), 5 %  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, M7522).

**TBS 1x:** 10 mM Tris-HCl pH 7.4 (Sigma-Aldrich, T1503), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich, S9888), con inhibidores proteasas (Sigma-Aldrich, 11836153001) y fosfatasas (Fisher Scientific, 15691759) al 1x.

### Preparación del extracto celular para la co-inmunoprecipitación:

Se eliminó el medio de las células y se lavaron durante 1 minuto a TA con *DMEM GlutaMAX* (4,5 g/l glucosa) (Gibco, 11574516), después de eliminar el *DMEM* se tripsinizaron con una solución al 0,25 % Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, T4049) incubando 1-2 minutos a 37°C hasta que se despegaron todas las células. Después, se inactivó la tripsina con medio *HEK293* y se pasaron las células a un tubo *Falcon* de 15 ml (*Falcon*, 430791) donde se centrifugaron (*Eppendorf*, 5804R) a 210 g, 4°C durante 10 minutos. A partir de este momento se trabajó siempre manteniendo la temperatura de las muestras a 4°C con hielo. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml *PBS 1x* pH 7.4 (Sigma-Aldrich, P4417-100TAB), después, se transfirieron a un *ependorf* de 1,5 ml (*Fisher Scientific*, MCT-150-C) antes de volver a ser centrifugadas a 210 g, 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lisó el pellet con 500  $\mu$ l *ColP lysis buffer*. Se pasó la lisis celular 10 veces a través de una jeringuilla (*Terumo*, BS-01T2613) y se incubó 30 minutos a 4°C en un agitador rotacional de tipo noria. Después se centrifugó a 12.000 g, 4°C durante 20 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo *ependiorf* de 1,5 ml. Durante 1 hora se bloqueó el sobrenadante con 80  $\mu$ l resina *G Sepharose Fast Flow* (Sigma-Aldrich, P3296) al 50 % en *PBS 1x* (preparada siguiendo el protocolo de la casa comercial). Por último, se centrifugó a 12.000 g, 4°C durante 1 minuto, se transfirió el sobrenadante a un nuevo *ependorf* de 1,5 ml y se guardó a -20°C una alícuota de 12  $\mu$ l del sobrenadante para cuantificar la concentración total de proteínas (*input*). Además, 40  $\mu$ l del sobrenadante fueron preparados para *Western blot*, como *Input* de la ColP, al añadirles 10  $\mu$ l de *sample buffer 5x* antes de calentar durante 5 minutos a 95°C. Después, se guardó a -20°C.

Co-inmunoprecipitaciones de proteínas con el epítipo GFP:

Después de guardar el *input* de la CoIP, al sobrenadante se le añadió 25 µl de la resina *GFP-Trap A* (*Chromotek, gta-20*) (preparada siguiendo el protocolo de la casa comercial) y se incubó toda la noche a 4°C en un agitador rotacional de tipo noria. A la mañana siguiente, se centrifugó a 2.500 g a 4°C durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante, guardando 10 µl para cuantificar la concentración total de proteínas (*post*) y 40 µl, que fueron preparados para *Western blot* como *post* de la CoIP (siguiendo el mismo protocolo que en el caso del *Input* CoIP). Se realizaron 3 lavados de la resina con 500 µl *GFP-Trap A buffer*, incubando durante 20 minutos a 4°C en un agitador rotacional de tipo noria, después se centrifugó a 2.500 g durante 2 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Por último, a la resina se le añadió 40 µl *sample buffer 2x* con 10 % β-Mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich, M7522*), se calentó 10 minutos a 95°C, se centrifugó a 2.500 g durante 2 minutos a TA y se guardó a -20°C el sobrenadante como inmunoprecipitado.

Co-inmunoprecipitaciones de proteínas con el epítipo Flag:

Después de guardar el *input* de la CoIP, al sobrenadante se le añadió 100 µl de la resina *ANTI-FLAG M2* (*Sigma-Aldrich, A2220*) (preparada siguiendo el protocolo de la casa comercial) y se incubó durante la noche a 4°C en un agitador rotacional de tipo noria. A la mañana siguiente, se centrifugó a 2.500 g durante 2 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, guardando (a -20°C) 12 µl para cuantificar la concentración total de proteínas (*post*) y otros 40 µl que fueron preparados para *Western blot* como *post* de la CoIP (siguiendo el mismo protocolo que en el caso del *input* CoIP). Se realizaron 3 lavados de la resina con 500 µl de *TBS 1x*, incubando durante 20 minutos a 4°C en un agitador rotacional de tipo noria. Después se centrifugó a 2.500 g, 4°C durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. A continuación, a la resina se le añadió 40 µl de *sample buffer 2x* sin β-Mercaptoetanol, se calentó 3 minutos a 95°C, se centrifugó a 5.000 g durante 1 minuto a TA y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo *ependorf* de 1,5 ml. Por último, se añadió 4 µl β-Mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich, M7522*) al sobrenadante y se calentó 4 minutos a 95°C antes de ser guardado como inmunoprecipitado a -20°C.

**9. Western blot.**

Anticuerpos primarios:

Anticuerpo	Referencia	Empresa	Especie	Dilución	Antígeno KDa
Calnexin	ADI-SPA-860-F	Enzo Life Sciences	Rabbit	1:1.000	95
c-Jun	9165	Cell Signaling	Rabbit	1:1.000	45
Flag M2	F1804	Sigma-Aldrich	Mouse	1:500	-
GAPDH	G9545	Sigma-Aldrich	Rabbit	1:4.000	37
GFP	A6455	Thermo Fisher - Invitrogen	Rabbit	1:2.000	30

## MATERIALES & MÉTODOS

HDAC3	SC-11417	Santa Cruz	Rabbit	1:500	50
HDAC4	H0163	Sigma-Aldrich	Mouse	1:500	140
HDAC4	SC-11418	Santa Cruz	Rabbit	1:500	140
HDAC5	SC-133106	Santa Cruz	Mouse	1:500	130
Krox20	ABE 1374	Millipore	Rabbit	1:500	55
MEF-2	SC-313	Santa Cruz	Rabbit	1:200	85
MPZ	PZ00308	Aves Lab	Chicken	1:1.000	28
NCoR1	5948S	Cell Signaling	Rabbit	1:1.000	270
Periaxina	-	cedido por Prof.P. Brophy	Rabbit	1:2.000	130

### Anticuerpos secundarios:

Anticuerpo	Referencia	Empresa	Dilución
HRP Rabbit anti-Chicken	A9046	Sigma-Aldrich	1:2.000
HRP Goat anti-Rabbit	7074	Cell Signaling	1:2.000
HRP Horse anti-Mouse	7076	Cell Signaling	1:2.000

### Rectivos:

**Geles de acrilamida:** Tris-HCl 1,5 M pH 8.8 y 0,5 M pH 6.8 (*Sigma-Aldrich, T1503*), 10 % SDS (*Sigma-Aldrich, L3771*), Acrylamide/bis Solution 30 % (37.5:1) (*Bio-Rad, 161-0158*), Ammonium Persulfate (APS) 10 % (*Sigma-Aldrich, A-3678*), TEMED (*Sigma-Aldrich, T9281*).

Gel Separador					Gel Stacking	
Reactivo	7,5 %	10 %	12 %	15 %	Reactivos	4%
H <sub>2</sub> O Mill Q	5,325 ml	4,825 ml	4,27 ml	3,5 ml	H <sub>2</sub> O Mill Q	3,54 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8.8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	Tris-HCl 0,5 M pH 6.8	1,25 ml
SDS 10 %	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	SDS 10 %	50 µl
Acrylamide 30 %	1,875 ml	2,475 ml	3,06 ml	3,825 ml	Acrylamide 30 %	0,49 ml
PSA 10 %	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	PSA 10 %	60 µl
TEMED	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	TEMED	7 µl

**RIPA Buffer:** PBS 1x pH 7.4 (*Sigma-Aldrich, P4417-100TAB*), 0,1 % SDS (*Sigma-Aldrich, L3771*), 1 % Nonidet P-40 (*Roche, 1754599*), 0,5 % Sodium Deoxycolate (*Sigma-Aldrich, D6750*), 5 mM EGTA (*Sigma-Aldrich, E3889-10G*), con inhibidores proteasas (*Sigma-Aldrich, 11836153001*) y fosfatasas (*Fisher Scientific, 15691759*) al 1x.

**Running Buffer:** 25 mM Trizma-Base (*Sigma-Aldrich, T1503*), 192 mM Glicina (*Sigma-Aldrich, G8898*), 1 % SDS (*Sigma-Aldrich, L3771*).

## MATERIALES & MÉTODOS

**Sample Buffer 5x:** 250 mM Tris-HCl pH 6.8 (*Sigma-Aldrich, T1503*), 10 % SDS (*Sigma-Aldrich, L3771*), 30 % Glicerol (*Sigma-Aldrich, G5516*), 0,05 % Bromophenol Blue (*Sigma-Aldrich, B-8026*), 5 %  $\beta$ -Mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich, M7522*).

**Solución de bloqueo:** 5 % Leche Desnatada en Polvo (Asturiana) diluida en TBS 1x.

**Transfer Buffer:** 25 mM Trizma-Base (*Sigma-Aldrich, T1503*), 192 mM Glicina (*Sigma-Aldrich, G8898*).

**TBS Buffer pH 7.6:** 20 mM Trizma-Base (*Sigma-Aldrich, T1503*), 137 mM NaCl (*Sigma-Aldrich, S9888*).

**TBS-t:** TBS Buffer, 1% Tween 20 (*AppliChem, A1389*).

### Extracción de proteínas de cultivos celulares:

Se eliminó el medio de las células y se lavaron durante 1 minuto a TA con *DMEM GlutaMAX* (4,5 g/l glucosa) (*Gibco, 11574516*), después de eliminar el *DMEM* se tripsinizaron con una solución al 0,25 % Tripsina-EDTA (*Sigma-Aldrich, T4049*) incubando 1-2 minutos a 37°C hasta que se despegaron todas las células. Después, se bloqueó la tripsina con medio *HEK293* y se pasaron las células a un tubo *Falcon* de 15 ml (*Falcon, 430791*) donde se centrifugaron (*Eppendorf, 5804R*) a 210 g y 4°C durante 10 minutos. A partir de este momento se trabajó siempre manteniendo la temperatura baja de las muestras con hielo. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml PBS 1x pH 7.4 (*Sigma-Aldrich, P4417-100TAB*), después, se transfirieron a un *ependorf* de 1,5 ml (*Fisher Scientific, MCT-150-C*) antes de volver a ser centrifugadas a 210 g 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lisó el pellet con 60  $\mu$ l *RIPA buffer*. Se sonicó 5 minutos a intervalos de 30 segundos on/off a 4°C en un *Biorruptor Pico* conectado a una *minichiller 300* (*Diagenode*), después se centrifugó a 15.300 g 4°C durante 20 minutos y transferimos el sobrenadante a un tubo *ependorf* de 1,5 ml. Se guardó a -20°C una alícuota de 12  $\mu$ l del extracto para cuantificar la concentración de proteínas totale. A 40  $\mu$ l de las muestras se les añadió 10  $\mu$ l de *sample buffer 5x*, se calentaron durante 5 minutos a 95°C y se guardo a -20°C.

### Extracto de proteínas de nervios ciáticos:

Se enfrió durante toda una noche a -80°C un tubo *ependorf* de 1,5 ml (*VWR, 20170-038*) con bolas de circonio (*Next Advance, ZrOB05*) por cada una de las muestras. A partir de este momento se trabajó siempre manteniendo la temperatura baja de las muestras con hielo. Al día siguiente, se añadieron 80  $\mu$ l de *RIPA buffer* dentro de cada uno de los *ependorf* y se introdujeron las muestras (1 cm del nervio *UI* o los primeros 8 mm del muñón distal del nervio lesionado). El tejido fue disgregado empleando un *Bullet Blender Homogenizer* (*Next Advance, BBX24-CE*) durante 1 minuto a velocidad 8 a TA, después se incubaron 5 minutos en hielo y se sonicaron 5

## MATERIALES & MÉTODOS

minutos a intervalos de 30 segundos on/off a 4°C en un *Biorruptor Pico* conectado a una *minichiller 300* (*Diagenode*). Se realizó una primera centrifugación a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C y transferimos el sobrenadante (sin arrastrar las bolas de circonio) a un *eppendorf* de 1,5 ml (*Fisher Scientific, MCT-150-C*), después, se realizó una segunda centrifugación a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C y transferimos el sobrenadante a un *eppendorf* de 1,5 ml. Se guardaron los extractos de proteínas de los nervios a -80°C.

### Cuantificación de la concentración de proteínas totales:

La cuantificación de la concentración de proteínas totales de cada muestra se realizó utilizando el *Pierce BCA Protein Assay Kit* (*Thermo Scientific, 23225*), se preparó la recta patrón abarcando de 20 a 2,000 µg/mL. La solución de BCA se preparó mezclando 200 µl del reactivo A con 4 µl del reactivo B por X, siendo X la suma de los 9 puntos de la recta patrón por duplicado más cada una de las muestras a cuantificar por triplicado (ejemplo: recta patrón por duplicado más 6 muestras a cuantificar por triplicado son un total de 36). Se pipetearon 200 µl de la solución de BCA en cada uno de los pocillos de una placa de 96 (*Greiner Bio-One, 655180*). En los 18 pocillos donde íbamos a pipetear la recta patrón añadimos 3 µl del *buffer* que se empleó para la lisis (*CoIP Lysis buffer* o *RIPA buffer*) y en los pocillos donde íbamos a pipetear las muestras añadimos 10 µl de H<sub>2</sub>O *Milli Q*, antes de pipetear 10 µl de las soluciones de la recta patrón o 3 µl de cada una de las muestras. Se mezcló cada uno de los pocillos pipeteando y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Medimos la absorbancia a 562 nm empleando un *Microplate Reader* (*Biochrom, EZ Read 400*). Por último, realizamos el promedio de las dos rectas patrón y extrapolamos la concentración de proteínas de las muestras realizando el promedio de las tres repeticiones.

### SDS-PAGE e Immunoblotting:

El equipo que se empleó para realizar los *Western blot* era de *Bio-Rad* (*1658006FC*). Se prepararon geles separadores de acrilamida a diferentes concentraciones, en función de los tamaños de las proteínas que queríamos cuantificar, lo normal fue preparar geles separadores de acrilamida al 10 %. En los casos de las *CoIP* (*inputs* y *posts*) y los extractos celulares de proteínas se cargaron 20 µg de proteínas totales, como las muestras ya se encontraban desnaturalizadas en *sample buffer* 1x, corregimos la concentración de proteínas totales al multiplicar por el factor de dilución 0,8. En el caso de los nervios se calculó el volumen que había que coger de cada una de las muestras para tener 12,5 µg y se pipetearon dentro de un *eppendorf* de 0,2 ml (*Axygen, PCR-02-C*), después se llevó el volumen a un volumen final de 10 µl añadiendo *RIPA buffer*, además se añadió 2,5 µl *sample buffer* 5x y se calentó 5 minutos a 95°C usando un *Mastercycler Thermocycler Personal* (*Eppendorf, 5332*). De las muestras de nervio desnaturalizadas solo se pipetearon 10 µl (cargandose 10 µg de proteínas totales). La electroforesis se realizó a 140 V en *running buffer* a TA, después se realizó la transferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (*Amersham Biosciences, RPN203D*) durante 2 horas a 4°C y 400 mA en



*transfer buffer*. La membrana se bloqueó durante 1 hora a TA en agitación suave (*Heidolph, Polymax 1040*) en solución de bloqueo, después se incubó durante 16 horas a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. A la mañana siguiente se lavó 3 veces en *TBS-t* durante 10 minutos en agitación media (*Heidolph, Polymax 1040*), se incubó 1 hora a TA con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo, y se volvió a lavar 3 veces en *TBS-t* durante 10 minutos en agitación media. En función de la proteína que íbamos a cuantificar se empleó un revelador diferente, para los controles de carga (*Calnexin* y *Gapdh*) además de la *GFP* y la *MPZ* se incubó la membrana durante 2 minutos a TA en oscuridad con una película del revelador siguiendo el protocolo descrito de *ECL Western Blotting Analysis System (Amersham, RPN2109)*, mientras que para el resto de las proteínas se incubó la membrana durante 5 minutos a TA en oscuridad con una película del revelador siguiendo el protocolo descrito de *ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (Amersham, RPN223)*. Después, para la adquisición de las imágenes se empleó un *Amersham Imager 680* realizando las adquisiciones en automático. Las cuantificaciones de las densitometrías de las imágenes se realizó empleando el *software Image Quant TL*, los valores de las densitometrías de las proteínas (*c-Jun*, *Krox-20* y *MPZ*) fueron divididos por los valores de las densitometrías de las *Gapdh* y *Calnexin* de cada muestra por separado, después se normalizaron a los valores de las muestras controles de cada *Western blot* también por separado (los valores de la *Gapdh* y los de la *Calnexin*), y por último, se promediaron los valores de las normalizaciones de la *Gapdh* y la *Calnexin*.

**10. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).**

Anticuerpos:

Anticuerpo	Referencia	Empresa	Especie	Concentración
H3K9Ac ChIP Grade	<i>Ab12179</i>	<i>Abcam</i>	Mouse	2,3 mg/ml
HDAC4	<i>H0163</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	Mouse	2 mg/ml
IgG2a ChIP Grade	<i>M7769</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	Mouse	5 mg/ml
Flag M2	<i>F1804</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	Mouse	1 mg/ml

Primers:

Primers	Especie	Secuencia (5´→3´)	
c-Jun Promoter	Rata	Forward	TGA GTG CAA GCG GTG TCT TA
		Reverse	GTC CCC GCT TCA GTA ACA AA
HDAC9 Promoter	Rata	Forward	GCT GCA ATC ACT CGG CCA T
		Reverse	GCC CAC AGG CAC AGA AAT AGA

Reactivos:

***PBS 1x pH 7.4 (Sigma-Aldrich, P4417-100TAB).***

**PFA 8 % pH 7.4** (*Sigma-Aldrich, P6148*) diluido en H<sub>2</sub>O Milli Q.

**Glicina 10x** (*Sigma-Aldrich, G8898*).

**ChIP Lysis Buffer.** 50 mM HEPES-KOH pH 8.1 (*Sigma-Aldrich, H3375*), 1 mM EDTA (*Panreac, 1316691209*), 0,5 mM EGTA (*Sigma-Aldrich, E3889-10G*), 140 mM NaCl (*Sigma-Aldrich, S9888*), 10 % Glicerol (*Sigma-Aldrich, G5516*), 0,5 % Nonidet P-40 (*Roche, 1754599*), 0,25 % Tritón X-100 (*Applichen, A1388,0500*), con inhibidores proteasas (*Sigma-Aldrich, 11836153001*) y fosfatasas (*Fisher Scientific, 15691759*) al 1x.

**ChIP Wash Buffer.** 10 mM Tris-HCl pH 8.0 (*Sigma-Aldrich, T1503*), 1 mM EDTA (*Panreac, 1316691209*), 0,5 mM EGTA (*Sigma-Aldrich, E3889-10G*), 200 mM NaCl (*Sigma-Aldrich, S9888*), con inhibidores de proteasas (*Sigma-Aldrich, 11836153001*) y de fosfatasas (*Fisher Scientific, 15691759*) al 1x.

**SDS Buffer.** 1 % SDS (*Sigma-Aldrich, L3771*), 10 mM EDTA (*Panreac, 1316691209*), 50 mM Tris pH 8.0 (*Sigma-Aldrich, T1503*).

**ChIP Dilution Buffer.** 0,01 % SDS (*Sigma-Aldrich, L3771*), 1,1 % Triton X-100 (*Applichen, A1388,0500*), 1,2 mM EDTA (*Panreac, 1316691209*), 16,7 mM Tris-HCl pH 8.1 (*Sigma-Aldrich, T1503*), 167 mM NaCl (*Sigma-Aldrich, S9888*), con inhibidores proteasas (*Sigma-Aldrich, 11836153001*) al 1x.

**Low Salt Wash Buffer.** 0,1 % SDS (*Sigma-Aldrich, L3771*), 1 % Triton X-100 (*Applichen, A1388,0500*), 2 mM EDTA (*Panreac, 1316691209*), 20 mM Tris-HCl pH 8.1 (*Sigma-Aldrich, T1503*), 150 mM NaCl (*Sigma-Aldrich, S9888*).

**Hight Salt Wash Buffer.** 0,1 % SDS (*Sigma-Aldrich, L3771*), 1 % Triton X-100 (*Applichen, A1388,0500*), 2 mM EDTA (*Panreac, 1316691209*), 20 mM Tris-HCl pH 8.1 (*Sigma-Aldrich, T1503*), 500 mM NaCl (*Sigma-Aldrich, S9888*).

**LiCl Wash Buffer.** 0,25 M LiCl (*Sigma-Aldrich, 203637*), 1 % IGEPAL-CA630 (*Sigma-Aldrich, I8896*), 1 % deoxycholic acid (*Sigma-Aldrich, D2510*), 1 mM EDTA (*Panreac, 1316691209*), 10 mM Tris-HCl pH 8.1 (*Sigma-Aldrich, T1503*).

**TE Buffer.** 10 mM Tris-HCl pH 8.0 (*Sigma-Aldrich, T1503*), 1 mM EDTA (*Panreac, 1316691209*).

### Obtención, lisado y sonicación de los núcleos de las SC de rata:

Se añadió 1 ml PFA 8 % sobre los 7 ml de medio que tenían las placas de cultivo de 10 cm<sup>2</sup> (*Falcon, 3453003*) con las SC, agitamos levemente e incubamos durante 10 minutos a TA. Se añadió 0,8 ml glicine 10x, volvimos a agitar e incubamos 5 minutos a TA. A partir de este momento se trabajó siempre manteniendo la temperatura baja de

las muestras con hielo. Se eliminó el medio y se realizaron 2 lavados con 10 ml *PBS* 1x pH 7.4 (sin agitar), se eliminó el *PBS* y recogimos las SC, dentro de un *eppendorf* de 1,5 ml (*Fisher Scientific, MCT-150-C*), despegándolas con una espátula (*Fisher Scientific, 50-201-974*) en 1 ml de *PBS* 1x pH 7.4 con inhibidores proteasas y fosfatasas al 1x y se centrifugaron (*Eppendorf, 5804R*) a 800 g y 4°C durante 10 minutos. se eliminó el sobrenadante y se lisaron las SC con 1 ml *ChIP lysis buffer* al homogenizar pasando 10 veces por una jeringuilla (*Terumo, BS-01T2613*), después se incubó durante 15 minutos a 4°C en un agitador rotacional de tipo noria y volvimos a centrifugar a 800 g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron los núcleos de las SC con 1 ml *ChIP Wash buffer*, se incubó durante 20 minutos a 4°C en un agitador rotacional de tipo noria y volvimos a centrifugar a 800 g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 ó 300 µl de *SDS buffer*, después se sonicó durante 15 minutos a intervalos de 30 segundos on/off a 4°C en un *Biorruptor Pico* conectado a una *minichiller 300* (*Diagenode*) y centrifugamos a 13.000 rpm (*Thermo Electron Corporation IEC microCL 17*) durante 3 minutos a TA. Finalmente, evitando resuspender el pellet alicuotamos las muestras dentro de *eppendorfs* de 1,5 ml (*Axygen, MCT-150-C*), 15 µl para la comprobación del estado de sonicación de las cromatinas y de 2 a 3 alícuotas de cromatina de 100 µl para ChIP que se guardaron a -80°C.

### Comprobación de la sonicación:

A cada una de las alícuotas de 15 µl se le añadió 175 µl H<sub>2</sub>O Milli Q + 8 µl NaCl 5 M e incubamos durante 4 horas a 65°C. Después se añadió 1 µl RNase A 10 mg/ml (*Fisher Scientific, 10618703*) e incubamos durante 1 hora a 37°C. Por último, añadimos 4 µl EDTA 0,5 M + 8 µl tris-HCl 1 M pH 8.0 + 1 µl Proteinasa K 20 mg/ml (*Sigma-Aldrich, 3115836001*) e incubamos 2 horas a 45°C. Purificamos y concentramos los fragmentos de cromatina siguiendo el protocolo descrito de *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen, 28104*), eluimos en 30 µl *elution buffer* y cargamos 15 µl en un gel de electroforesis de agarosa al 1% (*Sigma-Aldrich, A9539*) que contenía el bromuro de etidio. Las muestras corrieron junto a 5 µl de *DNA Ladder* (*Nippon Genetiks, B4MWD100*).

### Inmunoprecipitación:

Después de confirmar que la cromatina se encontraba bien sonicada (en fragmentos de 100 a 500 bp) se diluyeron (1:10) los 100 µl de cromatina con 900 µl *ChIP dilution buffer* para cada una de las precipitaciones que fuimos a realizar, antes se guardaron a -80°C un total de 30 µl de la cromatina diluida de cada una de las muestras, pipeteando de cada una de las diferentes alícuotas de cromatina preparadas de cada una de ellas, para el *input* de las qPCRs. Después se añadió a cada cromatina diluida 10 µg de los anticuerpos (en todas las inmunoprecipitaciones se realizaron los controles negativos con el anticuerpo IgG2a ChIP Grade) y 50 µl de las *Dynabeads Protein G* (*Life Technologies, 10004D*), se incubaron a 4°C en un agitador rotacional de tipo noria durante 24 horas. Al día siguiente, mediante el empleo de un imán se procedió a eliminar el sobrenadante y realizamos 4 lavados durante 5 minutos

a TA en un agitador rotacional de tipo noria, primero con 1 ml *low salt wash buffer*, segundo con 1 ml *high salt wash buffer*, tercero con 1 ml *LiCl wash buffer* y cuarto con 1 ml *TE buffer*. Para evitar arrastrar impurezas del tubo donde se ha realizado la inmunoprecipitación entre el tercer y cuarto lavado cambiamos de *ependofs* de 1,5 ml (*Axygen, MCT-150-C*). Después del cuarto lavado resuspendimos las *Dynabeads Protein G* con 200 µl del *elution buffer* (20 µl *SDS* 10 % + 20 µl *NaHCO<sub>3</sub>* 1 M (*Sigma-Aldrich, S7277*) + 160 µl *H<sub>2</sub>O Milli Q*), mientras que a los 30 µl de los *inputs* de las cromatinas se les añadió 170 µl del *elution buffer*. A cada una de las inmunoprecipitaciones se les añadió 8 µl *NaCl* 5 M e incubamos durante 4 horas a 65°C, después se añadió 1 µl *RNase A* 10 mg/ml (*Fisher Scientific, 10618703*) e incubamos durante 1 hora a 37°C. Por último, añadimos 4 µl *EDTA* 0,5 M + 8 µl *tris-HCl* 1 M pH 8.0 + 1 µl *Proteinasa K* 20 mg/ml (*Sigma-Aldrich, 3115836001*) e incubamos 2 horas a 45°C. Purificamos y concentramos los fragmentos de cromatina inmunoprecipitadas siguiendo el protocolo descrito de *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen, 28104*), eluimos en 30 µl *elution buffer*, las muestras fueron guardadas a -80°C. Mediante qPCR cuantificamos los fragmentos de los promotores de *c-Jun* y *HDAC9* que había en los *inputs* de las cromatinas y en los inmunoprecipitados. A la hora de cuantificar seguimos el protocolo explicado en el siguiente apartado (11. qPCR), pero en vez de usar el 18S para normalizar, empleamos los valores de las qPCR de los *inputs* de las cromatinas de cada una de las muestras.

## 11. qPCR.

### Primers:

Primers	Especie	Secuencia (5' → 3')	
18S	Rata	Forward	CTT AGA GGG ACA AGT GGC G
		Reverse	GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA
Artemina	Rata	Forward	ATC CAT TTG AGC TTC GGG GG
		Reverse	CCA CCC TCT TCT TGA GGC AG
c-Jun	Rata	Forward	AAG AAC ACA AAG CAG GGA GG
		Reverse	GGG AGT TCA TCC GCA ATC TA
Drp2	Rata	Forward	GAG AAG ATC CTG GCC CAT TT
		Reverse	CCT CAG CTC TCC CTG AAG AA
Gdnf	Rata	Forward	ACT GAC TTG GGT TTG GGC TA
		Reverse	CCT GGC CTA CCT TGT CAC TT
Hmgcr	Rata	Forward	TTG GTG GCC TCC ATT GAG AT
		Reverse	AGA GGC CAT GCA TAC GGA AA
Krox20	Rata	Forward	CCC AAT GGT GAA CTG GGA GG
		Reverse	TCC AAG GGC CTC TTC TCT CC
Mbp	Rata	Forward	TCC ATC CCA AGG AAA GGG GA
		Reverse	TCT GCC TCC GTA GCC AAA TC
Mpz	Rata	Forward	TGC CCT GCT CTT CTC TTC TTT
		Reverse	CCA TAG ACT TCC CTG TCC GTG
Olig1	Rata	Forward	TGC GCG AAG TTA TCC TAC CC

## MATERIALES & MÉTODOS

		<i>Reverse</i>	CAG CGT AGC GAT CTT GGA GA
Plp	Rata	<i>Forward</i>	GGC TAG GAC ATC CCG ACA AG
		<i>Reverse</i>	TGT ACA CAG GCA CAG CAG AG
Pmp22	Rata	<i>Forward</i>	TTG CAA AGA AAT CCA AGC GGA
		<i>Reverse</i>	AGA GTA GAA GCA TGG TGG CTG
Prx	Rata	<i>Forward</i>	AATGTG CCG AGC CCT ACA AG
		<i>Reverse</i>	AGG GGA CAG ACT CTG GAT GT
Runx2	Rata	<i>Forward</i>	GCA CCC AGC CCA TAA TAG AA
		<i>Reverse</i>	TGG AGA TGT TGC TCT GTT CG
Sox10	Rata	<i>Forward</i>	GCA GAA AGT TAG CCG ACC AG
		<i>Reverse</i>	GCG CTT GTC ACT CTC GTT CA
18S	Ratón	<i>Forward</i>	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA
		<i>Reverse</i>	GCT GGA ATT ACC GCG GCT
Bdnf	Ratón	<i>Forward</i>	GGT ATC CAA AGG CCA ACT GA
		<i>Reverse</i>	GCA GCC TTC CTT GGT GTA AC
c-Jun	Ratón	<i>Forward</i>	CCT TCT ACG ACG ATG CCC TC
		<i>Reverse</i>	GGT TCA AGG TCA TGC TCT GTT T
Drp2	Ratón	<i>Forward</i>	TGT CCC CAG CCT CAG GTT A
		<i>Reverse</i>	CAA CAG TCC CGT TCA AGA GC
Gdnf	Ratón	<i>Forward</i>	TCT CGA GCA GGT TCG AAT GG
		<i>Reverse</i>	AAG AAC CGT CGC AAA CTT TAC C
HDAC4	Ratón	<i>Forward</i>	CAT TGG AGG AGC TGC AGA CA
		<i>Reverse</i>	GGA AGC CTG ACG AAC ACT GA
HDAC5	Ratón	<i>Forward</i>	GGC ATG AAC TCT CCC AAC GA
		<i>Reverse</i>	CTT CAC CTC CAC TGC CAC AG
HDAC7	Ratón	<i>Forward</i>	CAC CTG TCA GAC CCA AGT CC
		<i>Reverse</i>	TGC TTG CTG TTG TCT CCA CA
HDAC9	Ratón	<i>Forward</i>	CCC CTA TGG GAG ATG TTG AG
		<i>Reverse</i>	CAA TGC ATC AAA TCC AGC AG
Hmgcr	Ratón	<i>Forward</i>	TGG ATC GAA GGA CGA GGA AAG
		<i>Reverse</i>	GAA TTA CGT CAA CCA TAG CTT CCG
Krox20	Ratón	<i>Forward</i>	ACC CCT GGA TCT CCC GTA TC
		<i>Reverse</i>	CAG GGT ACT GTG GGT CAA TGG
Mag	Ratón	<i>Forward</i>	GGAATCAGGAGACATCCCCAA
		<i>Reverse</i>	TTA TCC AAA ACA GCG GCA GG
Mbp	Ratón	<i>Forward</i>	ATC CAA GTA CCT GGC CAC AG
		<i>Reverse</i>	CCT GTC ACC GCT AAA GAA GC
Mpz	Ratón	<i>Forward</i>	ACC AGA CAT AGT GGG CAA GAC CTC
		<i>Reverse</i>	AAG AGC AAC AGC AGC AAC AGC ACC
Oct-6	Ratón	<i>Forward</i>	GAG CAC TCG GAC GAG GAT G
		<i>Reverse</i>	TGA TGC GTC GTT GCT TGA AC
Olig1	Ratón	<i>Forward</i>	AGC GAT GTA GTT GCT TGG GAT
		<i>Reverse</i>	CTG GCT CTA AAC AGG TGG GAT
p75 <sup>NTR</sup>	Ratón	<i>Forward</i>	TGA TGG AGT CGG GCT AAT GTC
		<i>Reverse</i>	AGA TTC ATC CCT CCA CAA ATG C

## MATERIALES & MÉTODOS

Pmp22	Ratón	<i>Forward</i>	GCT CTG TTC CTG TTC TTC TGC C
		<i>Reverse</i>	CAC TGT GCC TCA CTG TGT AGAT
Prx	Ratón	<i>Forward</i>	AGT GGC CAA GCT GAA CAT CC
		<i>Reverse</i>	AGA ACT CGA CGT CAA CAG GG
Runx2	Ratón	<i>Forward</i>	GTC TTC CAC ACG GGG CAC
		<i>Reverse</i>	GCC AGA GGC AGA AGT CAG AG
Sox2	Ratón	<i>Forward</i>	TCC AAA AAC TAA TCA CAA CAA TCG
		<i>Reverse</i>	GAA GTG CAA TTG GGA TGA AAA
Shh	Ratón	<i>Forward</i>	CAG CGA CTT CCT CAC CTT CCT
		<i>Reverse</i>	AGC GTC TCG ATC ACG TAG AAG AC

### Extracción de mRNA de cultivos de SC de rata:

Se eliminó el medio de las SC y se lavaron durante 1 minuto a TA con *DMEM GlutaMAX* (4,5 g/l glucosa) (*Gibco*, 11574516), después de eliminar el *DMEM* se tripsinizaron con una solución al 0,25 % Tripsina-EDTA (*Sigma-Aldrich*, T4049) incubando 1-2 minutos a 37°C hasta que se despegaron todas las células. Después, se bloqueó la tripsina con medio *HEK293* y se pasaron las células a un tubo *Falcon* de 15 ml (*Falcon*, 430791) donde se centrifugaron (*Eppendorf*, 5804R) a 210 g 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se extrajo el RNA siguiendo el protocolo descrito de *RNA isolation* (*Macherey-Nagel*, 740955.50) para células. Finalmente, se eluyó en 40 µl H<sub>2</sub>O *RNase Free*. Las concentraciones de mRNA de cada muestra se cuantificaron en un *Nanodrop* (*Thermo Scientific*, 1000), a partir de este momento se mantuvieron todas las muestras en hielo o se guardaron a -80°C.

### Extracción de mRNA de nervios ciáticos de ratones:

Se preparó para cada una de las muestras un *eppendorf* de 1,5 ml (*VWR*, 20170-038) con bolas de circonio (*Next Advance*, ZrOB05) y 250 µl *Trizol* (*Sigma-Aldrich*, T9424), que se mantuvo en hielo. En ellos se introdujeron las muestras (4 cm del nervio *UI* o los primeros 8 mm del muñón distal del nervio lesionado). El tejido fue disgregado empleando un *Bullet Blender Homogenizer* (*Next Advance*, BBX24-CE) durante 3 minutos a velocidad 8 a TA, después se incubaron 5 minutos en hielo, luego se incubaron 5 minutos a TA antes de añadir 50 µl *Cloroformo* (*Sigma-Aldrich*, 319988), después se agitaron durante 1 minuto invirtiendo los *eppendorfs* con la mano, se incubaron durante 3 minutos a TA y se centrifugó (*Eppendorf*, 5804R) a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante acuoso (sin arrastra las fases grasas y fenólicas) a un *eppendorf* de 1,5 ml (*Axygen*, MCT-150-C) y se purificó y concentró el RNA siguiendo el protocolo descrito de *RNA isolation* (*Macherey-Nagel*, 740955.50) para tejidos, al final, se eluyó en 40 µl H<sub>2</sub>O *RNase Free*. Las concentraciones de mRNA de cada muestra se cuantificaron en un *Nanodrop* (*Thermo Scientific*, 1000), a partir de este momento se mantuvieron todas las muestras en hielo o se guardaron a -80°C.

### Síntesis del cDNA y cuantificación mediante qPCR:

## MATERIALES & MÉTODOS

Al conocer las concentraciones de RNA que teníamos de cada una de las muestras, calculamos cuantos  $\mu\text{l}$  había que coger de cada una de ellas para tener de 500 a 1.000 ng y los pipeteamos dentro de un *ependorf* de 0,5 ml (*Axygen, 321-05-051*), los llevamos a un volumen final de 28  $\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  *RNase Free* antes de añadir 3,5  $\mu\text{l}$  *DNase I Buffer 5x* y 3,5  $\mu\text{l}$  *DNaseI RNase Free* (*Thermo Fisher Scientific, EN0521*), después incubamos a 37°C durante 30 minutos usando un *Mastercycler Termocycler Personal* (*Eppendorf, 5332*) para asegurarnos que no teníamos contaminación con DNA genómico. Para inhibir la *DNase I* se añadió 3,5  $\mu\text{l}$  de EDTA 50 mM (*Thermo Fisher Scientific, EN0521*) antes de incubar a 70°C durante 15 minutos, el producto de la digestión con la *DNase I* ya se podía emplear para la síntesis del cDNA, o se guardaba a -80°C. Para la síntesis del cDNA se empleó 10  $\mu\text{l}$  del RNA digerido con la *DNase I*, al cual se le añadió 1  $\mu\text{l}$  *dNTPs mix* 10 mM (*Sigma-Aldrich, D 7295*) + 1  $\mu\text{l}$  *Random Primers* 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (*Invitrogen, 48190-011*), se homogenizó dando unos golpes con el dedo a la mezcla antes de incubar a 65°C durante 5 minutos, después se incubó en hielo durante 5 minutos, luego añadimos 2  $\mu\text{l}$  *Buffer RT 5x* (*Thermo Scientific, EP0441*) + 2  $\mu\text{l}$  DTT 0,1 M (*Invitrogen, Y00147*) + 1  $\mu\text{l}$  *RNaseOUT* 40 U/ $\mu\text{l}$  (*Invitrogen, 10777-019*), se volvió a homogenizar dando unos golpes con el dedo a la mezcla antes de incubar a TA durante 2 minutos, por último, se añadió 2,5  $\mu\text{l}$  *Buffer RT 5x* + 0,5  $\mu\text{l}$  *RevertAid Reverse Transcriptase* 200 U/ $\mu\text{l}$  (*Thermo Scientific, EP0441*), y se volvió a homogenizar dando unos golpes con el dedo a la mezcla antes de incubar a TA durante 10 minutos. La retrotranscripción se realizó durante 1 hora a 42°C seguido de 15 minutos a 70°C, el cDNA obtenido ya se podía emplear para las qPCR, o se guardaba a -20°C. Para realizar el control de la retrotranscripción, y comprobar que no teníamos contaminación con DNA genómico, el proceso que seguíamos era idéntico al de la síntesis del cDNA a partir del producto de la digestión con la *DNase I*, pero en vez de añadir 2,5  $\mu\text{l}$  *Buffer 5x* + 0,5  $\mu\text{l}$  *RevertAid Reverse Transcriptase* 200 U/ $\mu\text{l}$  se añadieron 3  $\mu\text{l}$  *Buffer 5x*. Para realizar las qPCRs se utilizó un *QuantStudio 3 Real-Time PCR Systems* (*Applied Biosystems, A29343*). Para evitar la amplificación por una posible contaminación con DNA genómico en el cDNA, los *primers* fueron diseñados para caer en exones separados por un gran intrón (cuando fue posible). Para cada uno de los genes que cuantificamos, las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado de tres diluciones seriadas del cDNA (1/4, 1/8, 1/16) con  $\text{H}_2\text{O}$  *RNase Free* (total 6 reacciones por gen y muestra). Cada reacción contenía: 0,5  $\mu\text{l}$  *primer forward* 10 mM + 0,5  $\mu\text{l}$  *primer reverse* 10 mM + 13  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  *RNase Free* + 4  $\mu\text{l}$  *MasterMix qPCR ROx PyroTaq EvaGreen 5x* (*CMB, 08-24-00001*) + 2  $\mu\text{l}$  cDNA diluido. Las condiciones de qPCR fueron: 5 minutos a 50°C, 15 minutos a 95°C, 40 ciclos (30 segundos a 95°C, 32 segundos a 60°C, 32 segundos a 72°C donde se realizaba la lectura de la fluorescencia) y la curva de disociación. El valor del *threshold* para determinar los *Ct*, es el valor del ciclo al cual se produce la intersección entre una curva de amplificación y una línea umbral (*threshold*), de cada una de las reacciones se estableció manualmente en un valor de 0.1. La especificidad de los productos de PCR se determinó mediante el análisis de la curva de fusión. La cuantificación de la expresión de cada gen fue el resultado de promediar las relaciones entre los valores de *Ct* promedio, del duplicado de cada una de las diluciones del cDNA, de cada uno de los genes con las *Ct* promedio del 18S, de la misma dilución del cDNA, mediante la fórmula  $2^{-(Ct_{gen} - Ct_{18S})}$ . Por último, solo dimos como

## MATERIALES & MÉTODOS

resultados validos las cuantificaciones de las qPCRs cuya eficiencia de reacción, calculada mediante la fórmula de la pendiente  $\{[10^{(-1/\text{pendiente})}]-1\}$ , se encontraba entre 0,7 a 1,3.



## RESULTADOS

### A) Mecanismos moleculares que median la mielinización.

#### 1. El cAMP induce la traslocación nuclear de la HDAC4 en las células de Schwann.

Las SC de rata en cultivo expresan altos niveles de *c-Jun* y muy bajos o nada de *Krox-20* ni de las proteínas de la mielina. Cuando se les expone a altos niveles de cAMP cambian su morfología alargada bipolar por una más achatada y pierden los altos niveles de *c-Jun*, lo que permite la expresión de *Krox-20* y la diferenciación a SC pro-mielinizante (Bacallao and Monje, 2013; Monje et al., 2009; Monje et al., 2010; Parkinson et al., 2008; Parkinson et al., 2004). Para tratar de entender el mecanismo por el cual el cAMP regula los niveles de *c-Jun* y media en la diferenciación de las SC, hicimos una revisión bibliográfica exhaustiva. Encontramos que las células vasculares del músculo liso (VSMC del inglés “vascular smooth muscle cells”) responden a la lesión vascular incrementando la expresión de *c-Jun*, lo que induce su reprogramación hacia un “fenotipo de activación” que contribuye a la reparación vascular (Owens et al., 2004b). Interesantemente la subida de *c-Jun* y la transición al “fenotipo de activación” puede ser bloqueado por el cAMP. De hecho, se encontró que este segundo mensajero hace que la HDAC4 se transloque desde el citoplasma al núcleo de las VSMC, donde bloquea la actividad transcripcional de Mef2 al unirse a este factor de transcripción en el promotor de *c-Jun* (Gordon et al., 2009).

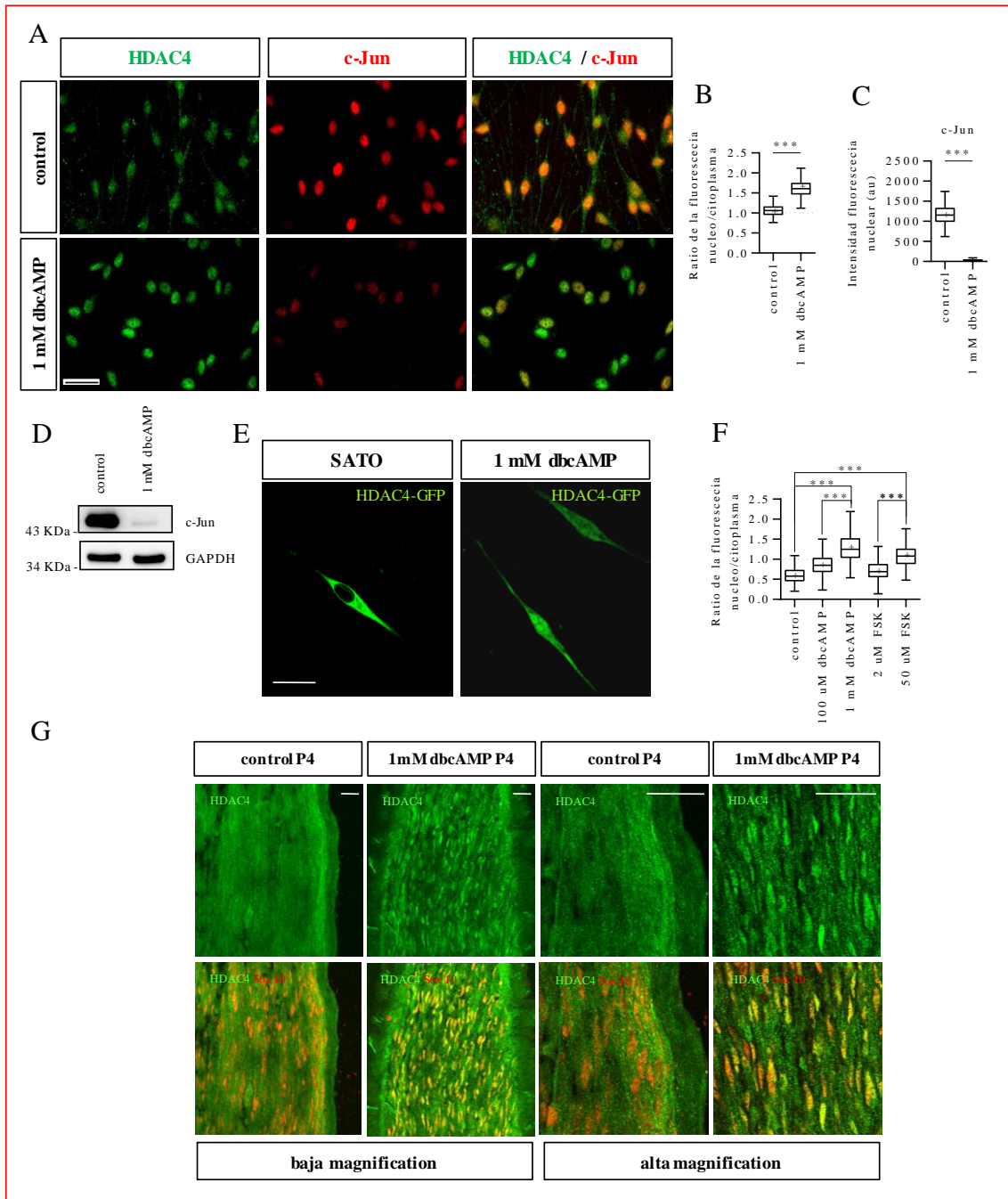
Para comprobar si en el caso de las SC ocurre lo mismo, lo primero que hicimos fue incubar durante 24 horas las SC de rata con medio SATO (control) (Bottenstein and Sato, 1979) o SATO más 1 mM dbcAMP (un análogo no hidrolizable y permeable del cAMP capaz, a esa dosis, de bloquear la expresión de *c-Jun* e inducir la diferenciación a SC pro-mielinizante) (Arthur-Farraj et al., 2011; Bacallao and Monje, 2013; Sobue et al., 1986). Después fijamos las SC con 4 % PFA y realizamos una inmunofluorescencia contra HDAC4. Como vemos el dbcAMP induce la traslocación nuclear de la HDAC4 (Figura 5.A paneles izquierdos) al tiempo que reduce los niveles de expresión de *c-Jun* (Figura 5.A paneles centrales). Para cuantificar la traslocación nuclear de la HDAC4 calculamos la ratio de la señal de fluorescencia entre el núcleo y el citoplasma, siendo  $r^{n/c} = 1,07 \pm 0,01$  en el control y  $r^{n/c} = 1,63 \pm 0,01$  en las SC tratadas con 1 mM dbcAMP (Figura 5.B). Además, cuantificamos la señal nuclear de *c-Jun* mediante el software *Metamorph Microscopy Automation and Image Analysis Software* obteniendo  $1176,70 \pm 9,75$  au para el control y  $25,56 \pm 1,36$  au en las SC tratadas con 1 mM dbcAMP (Figura 5.C). El *Western blot* contra *c-Jun* de un cultivo de SC de rata después de haberlas incubado durante 24 horas con 1 mM dbcAMP confirmó que este tratamiento es suficiente para bloquear la expresión de *c-Jun* (Figura 5.D).

Para confirmar esta observación de la proteína endógena, transfectamos las SC con 100 ng de un plásmido que contiene el constructo HDAC4-GFP bajo el promotor del CMV (Paroni et al., 2004), amablemente cedido por el Profesor Claudio Brancolini, del Departamento de Medicina y Ciencias Biológicas de la Universidad de Udine (Italia). A las 24 horas pos-transfección cambiamos el medio de expansión por medio SATO (control) o SATO con 1 mM dbcAMP. Después de dejar incubando las

SC otras 24 horas las fijamos con 4 % PFA y realizamos una inmunofluorescencia contra GFP. Como podemos ver en la [Figura 5.E](#), la calidad de la señal citoplasmática y nuclear de la HDAC4-GFP es mejor que en el experimento con la proteína endógena. De hecho, ahora en el control se puede distinguir la exclusión nuclear de la HDAC4-GFP ( $r^{n/c} = 0,62 \pm 0,01$ ) y como con 1 mM dbcAMP se produce una elevada traslocación nuclear de la HDAC4-GFP ( $r^{n/c} = 1,35 \pm 0,02$ ) ([Figura 5.F](#)), con lo que con 1 mM dbcAMP se incrementa más del doble la señal nuclear de la HDAC4 en las SC. Probablemente todavía vemos señal citoplasmática de la HDAC4-GFP con 1 mM dbcAMP debido a los altos niveles de expresión de esta proteína de fusión cuando está bajo el control del potente promotor del CMV.

Es bien sabido que el cAMP tiene diferentes efectos sobre las SC en función de la concentración a la que se aplique. A bajas concentraciones favorece los efectos mitogénicos de la NRG1 mientras que a altas concentraciones induce la diferenciación a SC pro-mielinizante ([Arthur-Farraj et al., 2011](#); [Limpert and Carter, 2010](#)). Para comprobar si existe una correlación entre el grado de la traslocación nuclear de la HDAC4 con los efectos pro-mielinizantes del cAMP en las SC procedimos a realizar una caracterización de los efectos de las bajas y altas concentraciones del cAMP sobre la traslocación nuclear de la HDAC4 en las SC. A bajas concentraciones de cAMP simuladas con 100  $\mu$ M dbcAMP ( $r^{n/c} = 0,89 \pm 0,01$ ) y con 2  $\mu$ M FSK ( $r^{n/c} = 0,72 \pm 0,01$ ) vemos como no se consigue inducir la traslocación nuclear de la HDAC4-GFP. Por el contrario, observamos que a altas concentraciones de cAMP simuladas con 1 mM dbcAMP ( $r^{n/c} = 1,35 \pm 0,02$ ) y con 50  $\mu$ M FSK ( $r^{n/c} = 1,12 \pm 0,01$ ) sí que se produce la traslocación nuclear de la HDAC4-GFP ([Figura 5.F](#)). Por lo que parece las diferencias entre los efectos pro-mitogénicos y pro-mielinizantes del cAMP están relacionados con que se produzca o no la traslocación nuclear de la HDAC4.

Por último, realizamos un experimento para comprobar si el cAMP induce la traslocación nuclear de la HDAC4 en las SC también *in vivo*. Para ello anestesiáramos ratas P4, expusimos sus nervios ciáticos y durante 1 hora uno de los nervios fue inmerso con suelo salino (control) y el otro nervio con suelo salino suplementado con 1 mM dbcAMP. Después fueron sacrificadas y los nervios ciáticos procesados para realizar una inmunofluorescencia contra HDAC4 y Sox10 (para identificar el núcleo de las SC). Como podemos observar en el control, la señal de la HDAC4 es difusa en todo el tejido, mientras que el cAMP induce una concentración de la señal de la HDAC4 que coincide con los núcleos de las SC (Sox10 positivos) ([Figura 5.G](#)). Con todos estos experimentos demostramos que las altas concentraciones del cAMP, que inducen la diferenciación de las SC a pro-mielinizantes (al bloquear la expresión de *c-Jun*), además producen también simultáneamente la translocación nuclear de la HDAC4 en las SC.



**Figura 5. El cAMP induce la traslocación nuclear de la HDAC4 en las células de Schwann. (A)** Cultivos de SC de rata fueron incubados durante 24 horas en medio SATO (control) o en medio SATO suplementado con 1 mM dbcAMP. Después se fijaron con 4 % PFA y se realizaron inmunofluorescencias para HDAC4 (verde) y c-Jun (rojo). La barra mide 5  $\mu$ m. **(B)** *Tukey's box plot* de la ratio de la densidad de fluorescencia de la HDAC4 entre el núcleo y el citoplasma de 900 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas. **(C)** *Tukey's box plot* de la densidad de fluorescencia nuclear de c-Jun de 600 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas. **(D)** Un cultivo de SC de rata fue incubado durante 24 horas en medio SATO (control) o en medio SATO suplementado con 1 mM dbcAMP y fue procesado para *Western blot* contra c-Jun. La Gapdh fue usada como control de carga. (n = 1). **(E)** Cultivos de SC de rata fueron transfectados con 100 ng de un plásmido HDAC4-GFP y a las 24 horas se cambió el medio por SATO (control) o SATO con diferentes concentraciones de cAMP, se volvieron a incubar 24 horas antes de ser fijados con 4 % PFA y realizar una inmunofluorescencia para GFP (verde). La barra mide 5  $\mu$ m. **(F)**

*Tukey's box plot* de la ratio de la densidad de fluorescencia de la HDAC4 entre el núcleo y el citoplasma de 900 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Los datos fueron analizados usando un ANOVA con una prueba de múltiples comparaciones de Tukey. **(G)** Experimento *in vivo*: ratas P4 fueron anestesiadas, el nervio ciático fue expuesto e inmerso en suelo salino (control) y suelo salino con 1 mM dbcAMP durante 1 hora. Después fueron sacrificadas, el nervio ciático fue fijado con 4 % PFA y procesado para inmunofluorescencia para la HDAC4 (verde) y Sox10 (rojo). Se muestran imágenes representativas tomadas por microscopía confocal a baja y alta magnificación. Las barras miden 25  $\mu$ m. En todos los *Tukey's box plot* el valor promedio esta señalado mediante una "+". \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

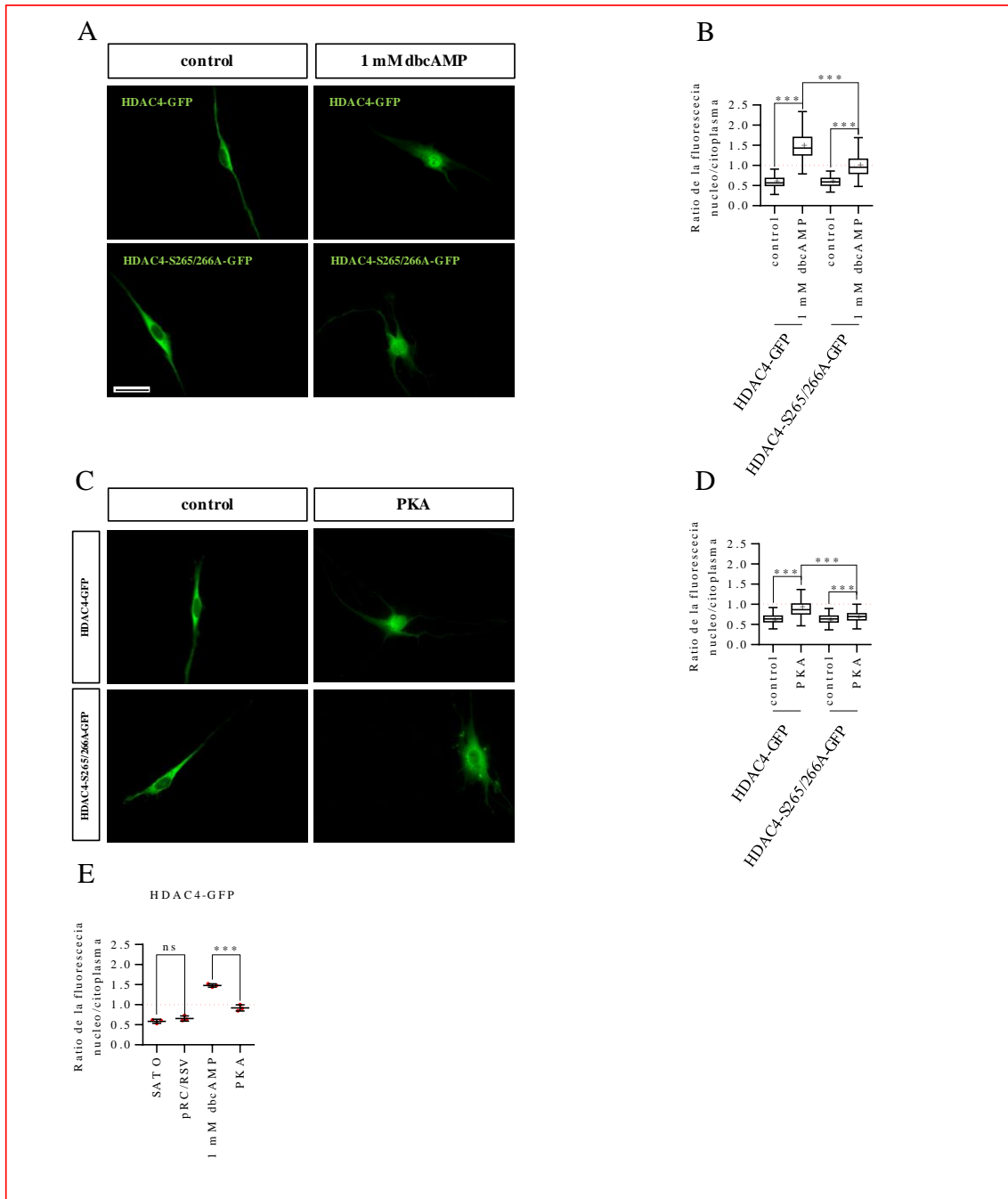
## 2. La fosforilación por la PKA regula la traslocación nuclear de la HDAC4 producida por el cAMP en las células de Schwann.

La localización subcelular de la HDAC4 está controlada mediante su fosforilación en determinados residuos de serina por diferentes proteínas quinasas como la CaMKII, las SIK1/2/3 y la PKD (Berdeaux et al., 2007; Paroni et al., 2008; Parra and Verdin, 2010). La fosforilación de la HDAC4 por estas quinasas en tres residuos de serina (Ser246, Ser467 y Ser632 en la HDAC4 humana) promueve su interacción con la proteína 14-3-3, dando como resultado su retención citoplasmática y la activación por des-represión de sus genes diana (como *Mef2* en el caso del músculo) (Grozinger and Schreiber, 2000; Helmstadter et al., 2011; Lu et al., 2000; Nishino et al., 2008). La desfosforilación de la HDAC4 en estas tres serinas, mediada por protein-fosfatasas como las PP1/2 y la fosfatasa de miosina, provoca su liberación de la proteína 14-3-3 y favorece su traslocación al interior del núcleo donde bloquea la expresión de sus genes diana (Fischer et al., 2002; Parra and Verdin, 2010). En otros sistemas se ha visto que el cAMP activa la PKA, la cual inhibe la actividad de las proteínas quinasas SIK1/2/3, atenuando la retención de la HDAC4 por la proteína 14-3-3 en el citoplasma (Henriksson et al., 2015; Walkinshaw et al., 2013a). La PKA también fosforila directamente a la HDAC4 en dos residuos de serina (Ser265 y Ser266 en la HDAC4 humana) promoviendo su traslocación al núcleo (Ha et al., 2010; Helmstadter et al., 2011; Liu and Schneider, 2013; Walkinshaw et al., 2013b).

Para estudiar si en el caso de las SC la traslocación nuclear de la HDAC4 inducida por el cAMP se encuentra mediada por la actividad de la PKA (Bacallao and Monje, 2013; Gordon et al., 2009), cambiamos mediante mutagénesis dirigida en un plásmido que contenía la HDAC4-GFP (cedido por el Dr. Claudio Brancolini) los residuos Ser265 y Ser266 por dos alaninas (Ala265 y Ala266), que no son fosforilables (Liu and Schneider, 2013). A continuación, transfectamos SC de rata con 100 ng del plásmido HDAC4-GFP o del HDAC4-S265/266A-GFP. A las 20 horas pos-transfección cambiamos el medio de expansión por medio SATO (control) o SATO suplementado con 1 mM dbcAMP, esperamos 4 horas más con los nuevos medios, fijamos con 4 % PFA y realizamos una inmunofluorescencia contra GFP. Como podemos ver en la condición control no existen diferencias en la localización intracelular entre la HDAC4-GFP ( $r^{n/c} = 0,59 \pm 0,01$ ) y la HDAC4-S265/266A-GFP ( $r^{n/c} = 0,60 \pm 0,01$ ) (Figura 6.A paneles de la izquierda; Figura 6.B). Mientras que en la condición 1 mM dbcAMP sí que vemos que la HDAC4-S265/266A-GFP se transloca al interior del núcleo de las SC ( $r^{n/c} = 1,01 \pm 0,02$ ) mucho menos que la HDAC4-GFP ( $r^{n/c} = 1,48 \pm 0,02$ ) (Figura 6.A paneles de la derecha; Figura 6.B). Por lo que las Ser265 y Ser266 son dos elementos de regulación importantes, a través de su fosforilación por la PKA, para la traslocación nuclear de la HDAC4 en las SC.

Para poder confirmar la importancia de la fosforilación de la PKA en las dos serinas (y para descartar que los resultados que hemos obtenido sean debido a la activación de otras cascadas de señalización celular por el cAMP, que también pueden estar actuando sobre la HDAC4 y no estamos teniendo en cuenta (Bacallao and Monje, 2013)) co-transfectamos SC de rata con 100 ng de los plásmidos HDAC4-GFP y HDAC4-S265/266A-GFP con 200 ng de un plásmido pRC/RSV vacío (control) o con 200 ng de un plásmido pRC/RSV que contiene el dominio catalítico activo de la PKA (ambos cedidos por el Dr. Angel Barco). A las 24 horas pos-transfección cambiamos el medio de expansión por medio SATO, dejamos otras 24 horas más con el nuevo medio antes de fijar las SC con 4 % PFA y realizar una inmunofluorescencia contra GFP. Como podemos observar, en el caso de los controles volvemos a no ver diferencias en la localización intracelular ni en los valores de la ratio núcleo citoplasma entre la HDAC4-GFP ( $r^{n/c} = 0,65 \pm 0,01$ ) y la HDAC4-S265/266SA-GFP ( $r^{n/c} = 0,63 \pm 0,01$ ) (Figura 6.C paneles de la izquierda; Figura 6.D), mientras que sí que vemos que el dominio catalítico de la PKA produce una mayor translocación nuclear de la HDAC4-GFP ( $r^{n/c} = 0,92 \pm 0,02$ ) que de la HDAC4-S265/266A-GFP ( $r^{n/c} = 0,70 \pm 0,01$ ) (Figura 6.C paneles de la derecha; Figura 6.D). Con esto confirmamos que la fosforilación de las Ser265 y Ser266 por la PKA es importante para la translocación nuclear de la HDAC4. Además concluimos que si bien el papel de la PKA es importante, este no es exclusivo, ya que los niveles de translocación nuclear de la HDAC4-GFP con el 1 mM dbcAMP ( $r^{n/c} = 1,48 \pm 0,02$ ) son mucho mayores que con la co-transfección con la PKA ( $r^{n/c} = 0,92 \pm 0,04$ ) (Figura 6.E) y además, la eliminación de los residuos fosforilables por la PKA no bloquea completamente su capacidad de traslocación nuclear en respuesta al cAMP.

En resumen, nuestros datos sugieren que uno de los mecanismos moleculares que emplea el cAMP para inducir la translocación nuclear de la HDAC4 es a través de la fosforilación de la HDAC4 en las Ser265 y Ser266 por la PKA.



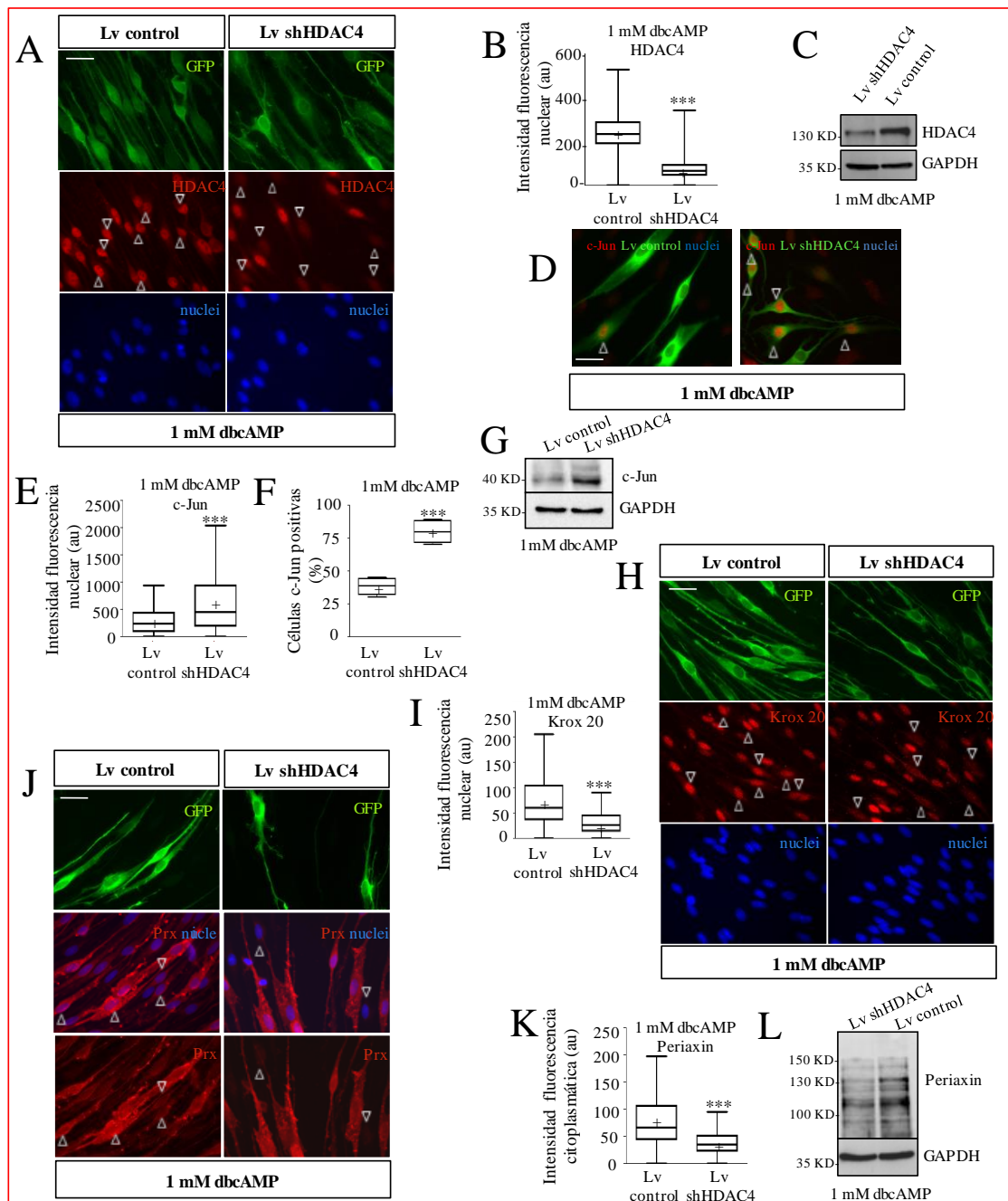
**Figura 6. La activación de la PKA por el cAMP induce la fosforilación de la HDAC4 en las Ser265 y Ser266 favoreciendo su traslocación nuclear en las células de Schwann. (A)** Cultivos de SC de rata fueron transfectados con 100 ng de un plásmido HDAC4-GFP o HDAC4-S265/266A-GFP, a las 20 horas se cambió el medio por SATO (control) o SATO con 1 mM dbcAMP, se volvió a incubar 4 horas antes de ser fijados con 4 % PFA y realizar una inmunofluorescencia para GFP (verde). La barra mide 5  $\mu$ m. **(B)** *Tukey's box plot* de la ratio de la densidad de fluorescencia de la HDAC4 entre el núcleo y el citoplasma de 300 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Los datos fueron analizados usando un ANOVA con una prueba de múltiples comparaciones de Tukey. **(C)** Cultivos de SC de rata fueron co-transfectados con 100 ng de un plásmido HDAC4-GFP o HDAC4-S265/266A-GFP con 200 ng de un plásmido pRC/RSV vacío (control) o con 200 ng de un plásmido pRC/RSV que contiene el dominio catalítico activo de la PKA. A las 24 horas se cambió el medio por SATO, se volvió a incubar 24 horas antes de ser fijados con 4 % PFA y realizar una inmunofluorescencia para GFP (verde). La barra mide 5  $\mu$ m. **(D)** *Tukey's box plot* de la ratio de la densidad de fluorescencia de la HDAC4 entre el núcleo y el citoplasma de 300 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Los datos fueron analizados usando un ANOVA con una prueba de múltiples comparaciones de Tukey. **(E)** Gráfica de puntos donde se representa el valor promedio de cada

una de las 3 repeticiones de los experimentos anteriores realizados al transfectar las SC de rata con el plásmido HDAC4-GFP. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas. En todos los *Tukey's box plot* el valor promedio esta señalado mediante una "+". \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

### 3. La eliminación de la HDAC4 bloquea la actividad diferenciadora del cAMP en las células de Schwann.

Nuestro siguiente paso fue estudiar si la eliminación de la HDAC4 afecta negativamente a la actividad diferenciadora del cAMP sobre las SC. Para ello realizamos una serie de experimentos de pérdida de función de la HDAC4 y su efecto sobre la capacidad del cAMP para bloquear la expresión de *c-Jun*, inducir la expresión de *Krox20* y de activar el programa de mielinización en las SC. Otros laboratorios habían conseguido reducir la síntesis de la proteína HDAC4 empleando RNA de interferencia (Kao et al., 2003), por lo que decidimos emplear un shRNAi para bloquear la expresión de la HDAC4 en cultivos de SC de rata. Para ello obtuvimos un plásmido que contenía un shRNAi específico para la HDAC4 (*pENTR/U6 HDAC4 shRNAi*, *addgene* n° 32220) (Mihaylova et al., 2011) y con el fabricamos un lentivirus empleando la tecnología *Gateway* (Lv shHDAC4). También generamos un lentivirus que contenía un vector de entrada con el *pENTR/U6* vacío de la misma manera para usarlo como control (Lv control). En los dos casos el vector de destino incluía la GFP bajo el promotor del CMV para identificar las SC infectadas. A continuación, infectamos SC de rata con los Lv control y Lv shHDAC4, esperamos 7 días para que la expresión de los shRNA fuera la óptima antes de cambiarles los medios de expansión por medio SATO con 1 mM de dbcAMP. Después de 24 horas en el nuevo medio se recogieron las SC y se procesaron para realizar *Westerns blots* contra la HDAC4, *c-Jun* y *Periaxina*, o se fijaron con 4 % PFA y se realizaron inmunofluorescencias contra GFP, HDAC4, *c-Jun*, *Krox-20* y *Periaxina*. Lo primero que hicimos fue comprobar que el Lv shHDAC4 en efecto reducía la expresión de la HDAC4 en las SC (Figuras 7.A y 7.C), siendo la señal de la inmunofluorescencia de la HDAC4 en el núcleo de las SC en el Lv control ( $240,79 \pm 4,57$  au) mucho mayor que en el caso del Lv shHDAC4 ( $73,17 \pm 2,65$  au) (Figura 7.B). Como podemos observar, la eliminación de la HDAC4 en las SC reduce la capacidad que tiene el cAMP de bloquear la expresión de *c-Jun* (Figuras 7.D y 7.G), siendo los niveles de la inmunofluorescencia de *c-Jun* en el núcleo de las SC infectadas con el Lv shHDAC4 ( $676,40 \pm 37,95$  au) mayores que los del Lv control ( $309,37 \pm 14,29$  au) (Figura 7.E). El mismo resultado lo obtuvimos cuando evaluamos los niveles de *c-Jun* de una manera semicuantitativa, como el porcentaje de SC "c-Jun positivas", siendo también en este caso el porcentaje de células positivas infectadas por el Lv shHDAC4 ( $63,50 \pm 3,57$  %) mayor que las SC infectadas con el Lv control ( $30,25 \pm 2,53$  %) (Figura 7.F). Además, pudimos observar que la eliminación de la HDAC4 en las SC reduce la capacidad del cAMP de inducir la expresión de *Krox20* (Figura 7.H), siendo la señal de la inmunofluorescencia de *Krox20* en el núcleo de las SC del Lv control ( $74,92 \pm 14,29$  au) mayor que con el Lv shHDAC4 ( $30,38 \pm 1,88$  au). También se redujo la expresión de *Periaxina* (una de las primeras proteínas de la mielina que se sintetizan cuando las SC inician el programa de mielinización (Parkinson et al., 2003) con niveles de  $81,29 \pm 2,29$  au para el Lv control y de  $42,63 \pm 1,52$  au para el Lv shHDAC4 (Figuras 7.J, 7.K y 7.L). En conjunto, podemos concluir

por lo tanto que la HDAC4 media los efectos del cAMP en la diferenciación en las células de Schwann.



**Figura 7. La eliminación de la HDAC4 bloquea la actividad diferenciadora del cAMP en las células de Schwann.** (A) Eliminación de HDAC4 mediante un shRNA: cultivos de SC de rata fueron infectados (durante 7 días) con Lv control o Lv shHDAC4 y se incubaron 24 horas con SATO 1 mM de dbcAMP. Después fueron fijados con 4 % PFA y se realizó una inmunofluorescencia contra GFP (verde), HDAC4 (rojo) y se contrastaron los núcleos con el reactivo de Hoechst. Las cabezas de flecha señalan los núcleos de las SC infectadas. La barra mide 5  $\mu$ m. (B) *Tukey's box plot* de la densidad de fluorescencia nuclear de la HDAC4 de 300 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas. (C) Un cultivo de SC de rata infectado con los Lv shHDAC4 y control, como lo descrito en el apartado A, fue procesado para realizar un *Western blot* contra la HDAC4, la Gapdh fue usada como control de carga. Un experimento típico, de al menos tres realizados, es mostrado. (D) SC de rata se infectaron e incubaron como se describe en el apartado A, pero la inmunofluorescencia se realizó contra GFP



(verde) y c-Jun (rojo). Las cabezas de flecha señalan los núcleos de las SC c-Jun positivos. **(E)** *Tukey's box plot* de la densidad de fluorescencia nuclear de c-Jun de 450 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas. **(F)** *Tukey's box plot* del porcentaje de SC c-Jun positivas. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas. **(G)** Un cultivo de SC de rata infectado con los Lv shHDAC4 y control, como lo descrito en el apartado A, fue procesado para realizar un *Western blot* contra c-Jun. La Gapdh fue usada como control de carga. **(H)** SC de rata se infectaron como se describe en el apartado A, pero la inmunofluorescencia se realizó contra GFP (verde), Krox-20 (rojo) y núcleos (Hoechst). Las cabezas de flecha señalan los núcleos de las SC infectadas. La barra mide 5  $\mu$ m. **(I)** *Tukey's box plot* de la densidad de fluorescencia nuclear de Krox-20 para 900 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas. **(J)** SC de rata se infectaron como se describe en el apartado A, pero la inmunofluorescencia se realizó contra GFP (verde), Periaxina (rojo) y núcleos (Hoechst). Las cabezas de flecha señalan los núcleos de las SC infectadas. La barra mide 5  $\mu$ m. **(K)** *Tukey's box plot* de la densidad de fluorescencia citoplasmática de la Periaxina de 600 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas. **(L)** SC de rata se infectaron como se describe en el apartado A y procesado para realizar un *Western blot* contra Periaxina. La Gapdh fue usada como control de carga. En todos los *Tukey's box plot* el valor promedio está señalado mediante una "+". \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

#### 4.- La activación de la HDAC4 es suficiente para bloquear la expresión de c-Jun.

Nuestro siguiente paso fue comprobar mediante experimentos de ganancia de función si la introducción de la HDAC4 dentro del núcleo de las SC era capaz de por sí de bloquear la expresión de *c-Jun*. Como podemos comprobar en la página 8 ([Figura 4](#)) del artículo adjunto a esta tesis ([Gomis-Coloma et al., 2018](#)), los resultados fueron contundentes. La sola transfección de la HDAC4-GFP es capaz de bloquear de manera parcial la expresión de c-Jun ( $r = 0,47 \pm 0,05$ ), mientras que la transfección de la versión mutante constitutivamente activa HDAC4-3SA-GFP en la que las tres serinas (Ser246, Ser467 y Ser632) han sido sustituidas por alaninas, y ya no es retenida por la 14-3-3 ([Parra, 2015](#)), bloquea la expresión de c-Jun ( $r = 0,22 \pm 0,03$ ) mucho más contundentemente.

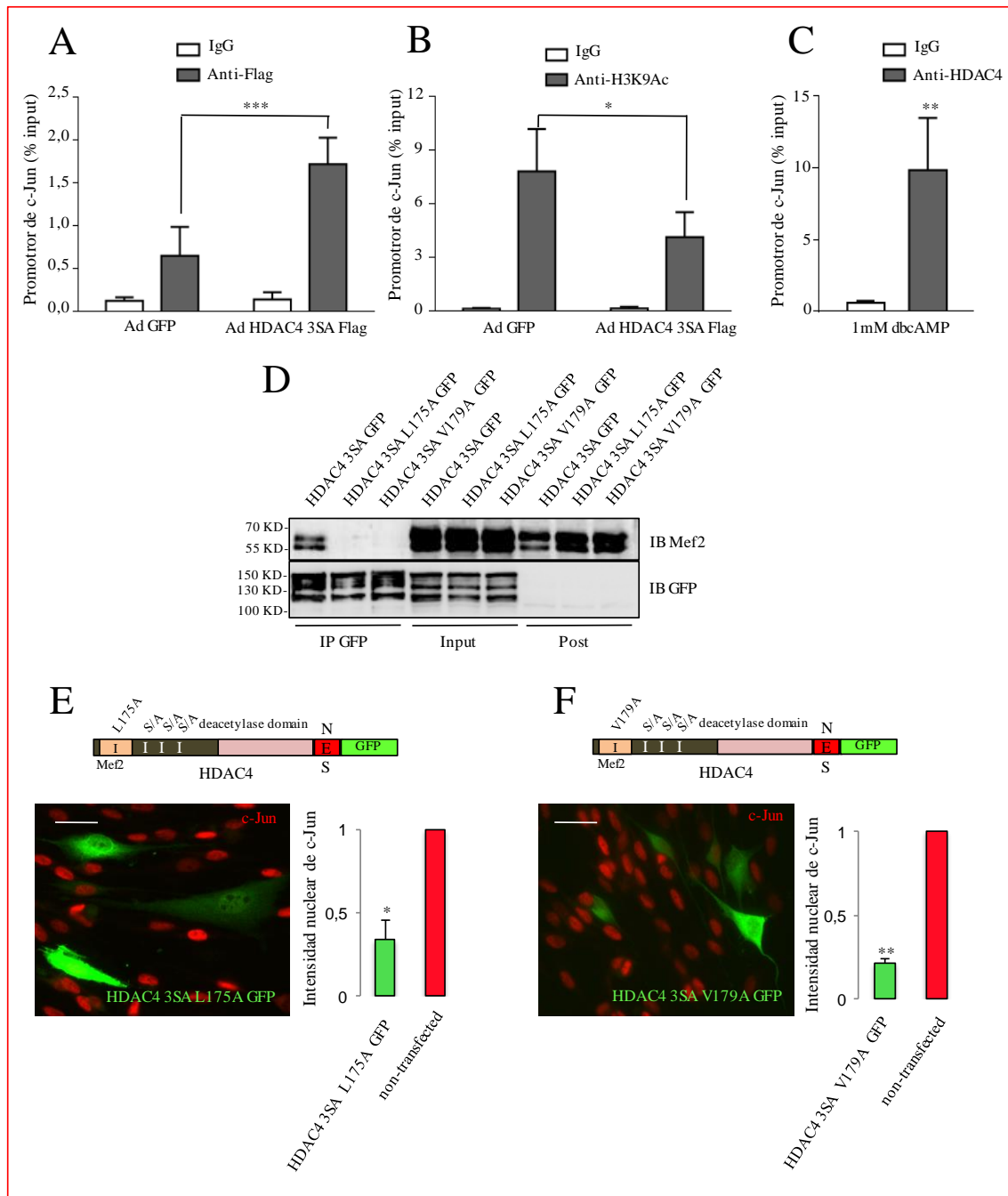
#### 5.- La HDAC4 se une al promotor de c-Jun y bloquea su expresión mediante un mecanismo independiente de Mef-2 en las células de Schwann.

Nuestro siguiente paso fue averiguar como una vez dentro del núcleo de las SC, la HDAC4 regula la expresión de *c-Jun* ([Backs et al., 2011](#); [Potthoff et al., 2007](#)). Para ello infectamos cultivos de SC de rata con un adenovirus HDAC4 3SAFlag (*abm 000547A*), para incrementar la eficiencia en la introducción de la HDAC4 dentro de los núcleos de las SC, o un adenovirus GFP (*abm 000541A*) como control. Tres días después cambiamos el medio por medio SATO y 24 horas más tarde recogimos las SC y las procesamos para realizar experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos contra el epítipo Flag, la H3K9Ac y una IgG inespecífica. Como se puede observar en la [Figura 8.A](#), cuando utilizamos el anticuerpo anti-Flag recuperamos mayor cantidad del promotor de *c-Jun* en las SC infectadas con el Ad HDAC4 3SA Flag ( $1,72 \pm 0,31$  % del *input*) que en las células control infectadas con el Ad GFP ( $0,65 \pm 0,33$  % del *input*). En contraste, los niveles de *c-Jun* que recuperamos con las IgGs en ambos casos fueron muy bajas ( $0,30 \pm 0,12$  y  $0,27 \pm 0,10$  % del *input* respectivamente) ([Figura 8.A](#)). En conjunto nuestros datos muestran que la HDAC4 se localiza físicamente sobre el promotor de *c-Jun*. Además,

detectamos que la histona 3 asociada a dicho promotor se encontraba menos acetilada en la lisina 9 (en los ChIPs con el anticuerpo anti-H3K9Ac de las SC infectadas con el Ad HDAC4 3SA Flag recuperamos un  $4,13 \pm 1,40$  % del *input* mientras que en las células infectadas con el virus control recuperamos el  $7,80 \pm 2,37$  % del *input* (Figura 8.B)) lo que sugiere una actividad transcripcional disminuida. Para confirmar estos datos exploramos si al igual que la exógena, la HDAC4 endógena de las SC se une también al promotor de *c-Jun*. Para ello incubamos durante 24 horas cultivos de SC de rata con medio SATO 1 mM dbcAMP y realizamos ensayos de ChIP con un anticuerpo anti-HDAC4 y una IgG inespecífica como control negativo. Utilizando esta aproximación comprobamos que con el anticuerpo anti-HDAC4 recuperábamos un  $9,85 \pm 3,63$  % del *input*, mientras que con la IgG apenas recuperábamos promotor de *c-Jun* ( $0,60 \pm 0,14$  % del *input*) (Figura 4.C). En conjunto nuestros datos sugieren que una vez dentro del núcleo de las SC la HDAC4 se une al promotor de *c-Jun* y promueve la desacetilación de la lisina 9 de la histona 3, reprimiendo de esta manera su expresión.

Las HDACs de clase IIa (a la cual pertenece la HDAC4) no se unen directamente al DNA, sino que emplean diferentes factores de transcripción (como Mef2 (Gordon et al., 2009) o Runx2 (Shimizu et al., 2014)) para regular la actividad transcripcional. Decidimos estudiar si la unión de la HDAC4 al promotor de *c-Jun* se realizaba a través Mef2. Para ello inactivamos su dominio de unión a Mef2 localizado en el extremo N-terminal de la HDAC4 (Han et al., 2005), mediante mutagénesis dirigida, empleando como diana el plásmido que contenía la HDAC4-3SA-GFP (amablemente cedido por el Dr. Claudio Brancolini (Paroni et al., 2008; Paroni et al., 2007)). Mediante esta aproximación cambiamos la lisina 175 por alanina (HDAC4-3SA-L175A-GFP) y la valina 179 por alanina (HDAC4-3SA-V179A-GFP). Lo primero que hicimos fue comprobar mediante un experimento de CoIP si estas mutaciones eliminaban la unión entre la HDAC4 y Mef2. Para ello utilizamos células *RT4D6* (una línea celular derivada de schwannoma de rata que retiene muchas de las propiedades de las SC (Hai et al., 2002)) porque la eficiencia de la transfección es muy superior a la de los cultivos de SC de rata (20 % transfección en RT4D6 vs 1 % SC de rata). Transfectamos las *RT4D6* con 1  $\mu$ g de los plásmidos HDAC4-3SA-GFP, HDAC4-3SA-L175A-GFP y HDAC4-3SA-V179A-GFP. A las 48 horas recogimos las *RT4D6* procesándolas para la CoIP empleando la resina GFP-Trap\_A (Chromotek, *gta-20*) y realizamos un *Western Blot* contra GFP y Mef2. Comprobamos que ambas mutaciones, L175A y V179A, eliminaban de forma muy efectiva la interacción física de la HDAC4 con Mef2 (Figura 8.D). Nuestro siguiente paso fue estudiar si las dos versiones mutantes, L175A y V179A, seguían siendo capaces de bloquear la expresión de *c-Jun* en las SC. Para ello transfectamos cultivos de SC de rata con 1  $\mu$ g de los plásmidos HDAC4-L175A-GFP y HDAC4-V179A-GFP, a las 24 horas post-transfección cambiamos el medio por medio SATO. Tras incubar otras 24 horas fijamos las SC con 4 % PFA y realizamos una inmunofluorescencia contra c-Jun (rojo) y GFP (verde), cuantificamos la señal de la inmunofluorescencia de c-Jun en el núcleo de las SC transfectadas (verdes) y en el de las SC vecinas no transfectadas (no verdes). Después normalizamos la señal de c-Jun de las SC transfectadas con respecto a la señal de las SC vecinas no transfectadas. Pudimos ver que la HDAC4-3SA-L175A-GFP sigue bloqueando la expresión de c-Jun ( $r = 0,30 \pm 0,03$ ) (Figura

8.E), al igual que ocurre con la HDAC4-3SA-V179A-GFP ( $r = 0,25 \pm 0,04$ ) (Figura 8.F), ambas con potencia similar a como lo bloquea la HDAC4-3SA-GFP ( $r = 0,22 \pm 0,03$ ) (página 8 (Figura 4.D) del artículo adjunto a esta tesis (Gomis-Coloma et al., 2018)). Estos datos demuestran claramente que la HDAC4 no necesita unirse a Mef2 para bloquear la expresión de *c-Jun*. En resumen, nuestros datos demuestran que la HDAC4, una vez dentro del núcleo de las SC, bloquea la expresión de *c-Jun* mediante un mecanismo que no depende de su interacción con Mef2.



**Figura 8. La HDAC4 se une al promotor de *c-Jun* y bloquea su expresión por un mecanismo independiente de Mef2, en las células de Schwann. (A)** Cultivos de SC de rata fueron infectados con Ad HDAC4-3SA-Flag o Ad GFP (control) y después de 3 días se cambiaron los medios por medio SATO. Tras incubar 24 horas se realizó el *cross-linking* de proteínas al DNA con 1 % PFA y se realizaron los experimentos de CHIP, empleando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Flag. Una

IgG de ratón no específica (ChIP grade) sirvió como control negativo. Se realizaron qPCRs empleado primers específicos de la región promotora de *c-Jun*. Los valores se normalizaron al valor del *input* de la cromatina de cada uno de los experimentos. Se muestra la media  $\pm$  error estándar ( $n = 5$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. **(B)** De manera paralela se realizaron ChIPs de las mismas muestras que en el apartado A empleando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-H3K9Ac. Los resultados se procesaron y se muestran como en el apartado A ( $n = 5$ ). **(C)** Experimento de ChIP con la HDAC4 endógena: incubamos durante 24 horas cultivos de SC de rata (sin infectar) con SATO 1 mM dbcAMP, después realizamos el cross-linking con 1 % PFA y recogimos las SC para realizar los experimentos de ChIP empleando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HDAC4. Una IgG de ratón no específica (ChIP grade) se utilizó como control. Los resultados se procesaron y se muestran como en el apartado A ( $n = 5$ ). **(D)** Bloqueando la interacción entre HDAC4 y Mef2: se transflectaron RT4D6 con 1  $\mu$ g de los plásmidos HDAC4-3SA-GFP, HDAC4-3SA-L175A-GFP y HDAC4-3SA-V179-GFP. A las 48 horas pos-transfección se recogieron las células y se realizaron las CoIPs empleando una resina *GFP-Trap\_A* (*Chromotek*) y analizamos los resultados mediante Western blot empleando anticuerpos contra GFP y Mef2 ( $n = 1$ ). **(E)** El bloqueo de la interacción con Mef2 no elimina la capacidad de HDAC4 de silenciar *c-Jun*. Cultivos de SC de rata fueron transflectados con 1  $\mu$ g del plásmido HDAC4-3SA-L175A-GFP, a las 24 horas pos-transfección se cambiaron los medios por medio SATO, después de incubar 24 horas se fijaron con 4 %PFA y se realizó inmunofluorescencia contra GFP (verde) y *c-Jun* (rojo). Cuantificamos la señal de la inmunofluorescencia de *c-Jun* en el núcleo de las SC transflectadas (verdes) y el de las SC vecinas no transflectadas, después normalizamos la señal de *c-Jun* de las SC transflectadas con respecto a la señal de las SC vecinas no transflectadas. Se muestra el valor promedio de 300 cuantificaciones (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata)  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. La barra mide 5  $\mu$ m **(F)** Cultivos de SC de rata fueron transflectados con 1  $\mu$ g del plásmido HDAC4-3SA-V179A-GFP y se realizó el mismo experimento que en el apartado E. La barra mide 5  $\mu$ m. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

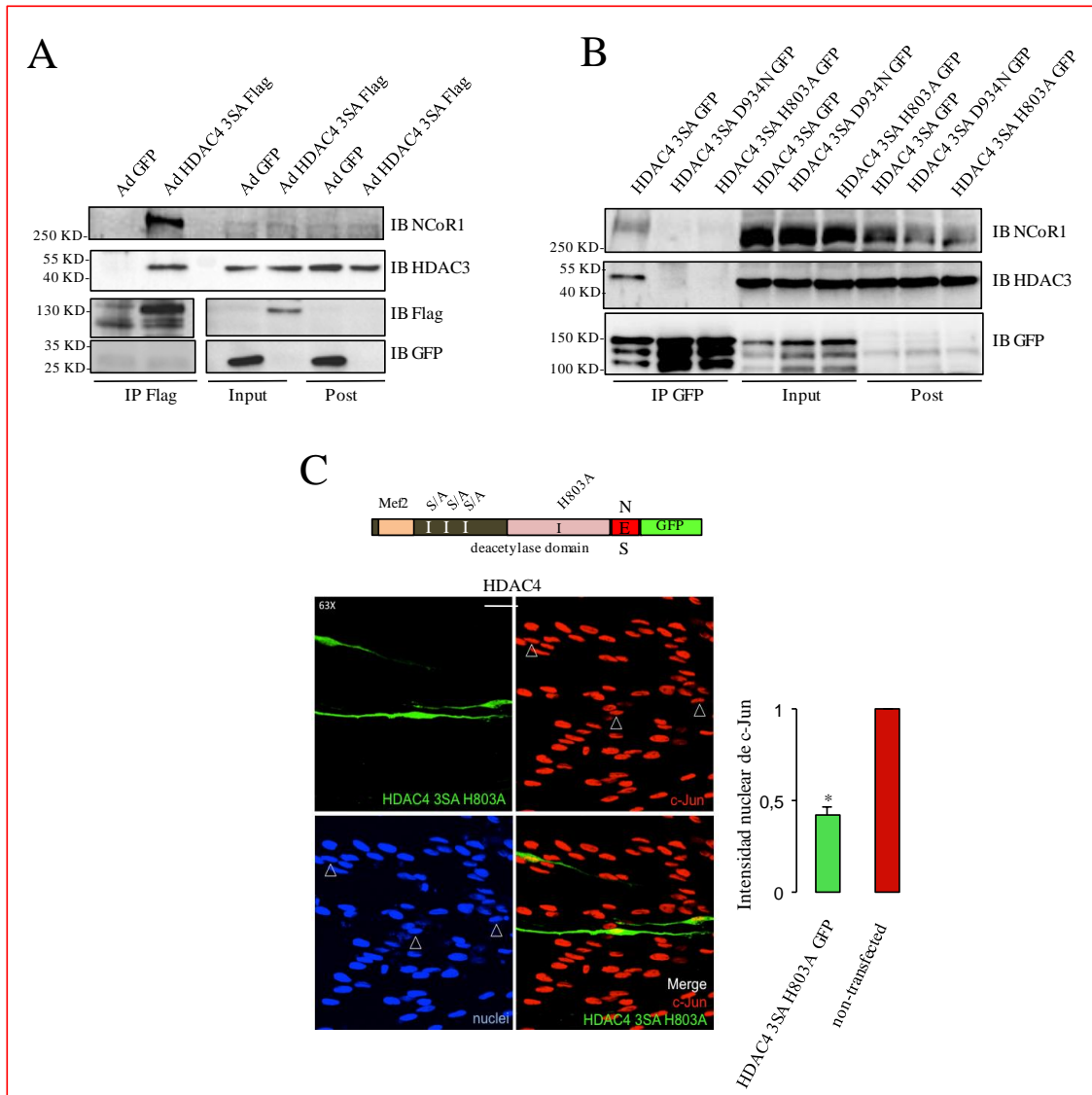
## 6. La HDAC4 recluta la actividad desacetilasa de otras HDACs para bloquear la expresión de *c-Jun* en las células de Schwann.

La HDAC4 fue descubierta tras el aislamiento de un nuevo cDNA en muestras humanas cuya secuencia se asemejaba a la de HDAC1 de las levaduras. De hecho se pudo comprobar que la proteína que codificaba éste cDNA presentaba *in vitro* actividad desacetilasa de histonas a través de su extremo C terminal (Fischle et al., 1999). Posteriormente se descubrió que en realidad HDAC4 no tiene actividad deacetilasa. La actividad desacetilasa de histonas que se le atribuyó inicialmente era debida a que es capaz de reclutar a la HDAC3, una HDAC de clase I que presenta una potente actividad desacetilasa (Emiliani et al., 1998). Además de con HDAC3, HDAC4 forma un complejo de múltiples proteínas, entre ellas los co-represores NCoR1/SMRT (Fischer et al., 2002). Posteriormente se descubrió que la HDAC4, al igual que el resto de las HDACs de clase IIa, carecen de actividad desacetilasa debido la sustitución de la tirosina 976 por una histidina en el dominio catalítico (Lahm et al., 2007).

Con estos antecedentes procedimos a estudiar cual es el mecanismo molecular que utiliza la HDAC4 para desacetilar la lisina 9 después de unirse a la histona 3 en el promotor de *c-Jun*. Para ello primero infectamos cultivos de SC de rata con el Ad HDAC4 3SA Flag y el Ad GFP (control). 48 horas pos-infección se recogieron las SC procediendo a realizar una CoIP empleando una resina anti-FLAG M2 (*Sigma-Aldrich*, A2220) y realizamos un *Western Blot* contra NCoR1, HDAC3, Flag y GFP. Descubrimos que la HDAC4 dentro del núcleo de las SC forma un complejo con las proteínas NCoR1 y HDAC3 (Figura 9.A). Nuestro siguiente paso fue estudiar si el bloqueo de la transcripción de *c-Jun* depende de la capacidad de la HDAC4 para asociarse con la HDAC3 en el núcleo de las SC. Primero introdujimos las mutaciones D934N y H803A (cada una de las cuales elimina la capacidad de la HDAC4 para reclutar NCoR1 y la HDAC3 (Fischle et al., 2002)) en el plásmido HDAC4-3SA-GFP

mediante mutagénesis dirigida. Después transfectamos *RT4D6* con 1  $\mu$ g de los plásmidos HDAC4-3SA-GFP, HDAC4-3SA-D943N-GFP y HDAC4-3SA-H803A. A las 48 horas recogimos las *RT4D6* procesándolas para la CoIP empleando la resina *GFP-Trap\_A* y realizamos un *Western Blot* contra NCoR1, HDAC3 y GFP. Comprobamos así que las dos mutaciones, D934N y H803A, eliminaban de forma muy efectiva la interacción física de la HDAC4 con NCoR1 y la HDAC3 también en las células de Schwann ([Figura 9.B](#)).

Por último, introducimos ambas versiones mutantes de la HDAC4 en cultivos de SC de rata y estudiamos su capacidad para bloquear la expresión de *c-Jun*. Para ello transfectamos cultivos de SC de rata con 1  $\mu$ g del plásmido HDAC4-3SA D934N-GFP, HDAC4-3SA H803A-GFP o HDAC4-3SA GFP. A las 24 horas pos-transfección cambiamos el medio por medio SATO y tras incubar otras 24 horas fijamos las SC con 4 % PFA y realizamos unas inmunofluorescencias contra *c-Jun* (rojo) y GFP (verde). A continuación, cuantificamos la señal de la inmunofluorescencia de *c-Jun* en el núcleo de las SC transfectadas (verdes) y el de las SC vecinas no transfectadas (no verdes) y después normalizamos la señal de *c-Jun* de las SC transfectadas con respecto a la señal de las SC vecinas no transfectadas. Como podemos ver ambos mutantes si bien siguen bloqueando la expresión de *c-Jun* (HDAC4-3SA H803A-GFP  $r = 0,48 \pm 0,04$ ) ([Figura 9.C](#)) (HDAC4-3SA D934N-GFP  $r = 0,53 \pm 0,04$  página 10 ([Figura 6.D](#)) del artículo adjunto a esta tesis ([Gomis-Coloma et al., 2018](#))) esta capacidad está notablemente disminuida cuando se compara con la de HDAC4-3SA-GFP ( $r = 0,22 \pm 0,03$ ) (página 8 ([Figura 4.D](#)) del artículo adjunto a esta tesis ([Gomis-Coloma et al., 2018](#))). En conjunto, nuestros datos sugieren que la deacetilación de la histona 3 en el promotor de *c-Jun* está en parte mediada por la capacidad de la HDAC4 para reclutar a la HDAC3.



**Figura 9. La HDAC4 recluta a la HDAC3 mediante la formación de un complejo con NCoR1 desacetilando la lisina 9 de la H3 y bloqueando la expresión de c-Jun. (A)** HDAC4 forma un complejo con NCoR1 y HDAC3 en SC: cultivos de SC de rata fueron infectados con el Ad HDAC4-3SA-Flag y el Ad GFP (control). Tras 48 horas se recogieron las SC y se realizó una CoIP empleando una resina Anti-FLAG M2 (*Sigma-Aldrich*). Realizamos un Western Blot contra NCoR1, HDAC3, Flag y GFP. Se muestran los resultados de un experimento típico (n = 3). **(B)** Bloqueando la formación del complejo: se transfectaron RT4D6 con 1 µg de los plásmidos HDAC4-3SA-GFP, HDAC4-3SA-S934N-GFP y HDAC4-3SA-H803A-GFP. A las 48 horas se recogieron las células y se realizaron las CoIPs empleando una resina *GFP-Trap\_A* (*Chromotek*). Analizamos los resultados mediante *Western blot* empleando anticuerpos contra GFP, NCoR1 y HDAC3. **(C)** El bloqueo de la formación del complejo disminuye el poder represor de HDAC4: cultivos de SC de rata fueron transfectados con 1 µg del plásmido HDAC4-3SA-H803A-GFP y a las 24 horas incubaron en medio SATO. Después de 24 horas se fijaron las SC con 4 %PFA y se realizaron inmunofluorescencias contra GFP (verde) y c-Jun (rojo). Los núcleos se tiñeron con el reactivo de Hoescht. Cuantificamos la señal de la inmunofluorescencia de c-Jun en el núcleo de las SC transfectadas (verdes) normalizmos frente a las SC vecinas no transfectadas. Se muestra el valor promedio de 300 cuantificaciones (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata) ± el error estándar. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. La barra mide 5 µm. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

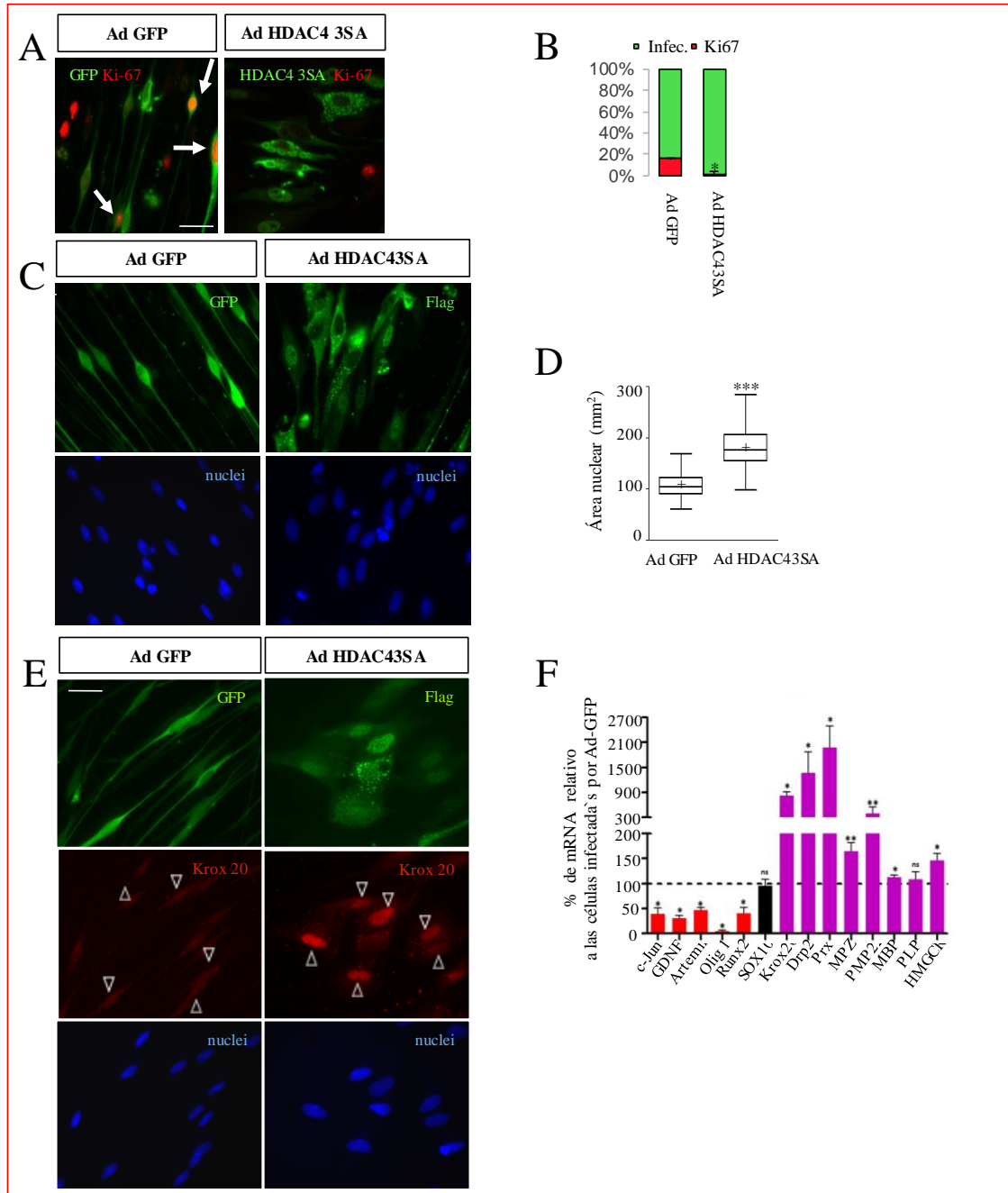
## 7. La traslocación nuclear de la HDAC4 inicia la expresión genética del programa de mielinización en las células de Schwann.

Puesto que c-Jun es un acreditado “regulador negativo” de la mielinización, la siguiente pregunta que nos hicimos fue ¿es la bajada en la expresión de c-Jun el único efecto de la traslocación nuclear de la HDAC4, o el efecto va más allá, y se activa también el programa completo de diferenciación de las células de Schwann?. Lo primero que estudiamos fue el efecto de la HDAC4 sobre el ciclo celular, ya que este se detiene para permitir la diferenciación de las SC. Para ello infectamos cultivos de SC de rata con Ad HDAC4 3SA Flag y Ad GFP (control). A las 48 horas pos-infección cambiamos los medios por medio SATO, después incubamos durante 24 horas antes de fijar las SC con 4 % PFA y realizamos inmunofluorescencias contra Flag, GFP y Ki-67. Descubrimos que al introducir la HDAC4 dentro del núcleo de las SC (Ad HDAC4 3SA Flag) deteníamos la proliferación celular (tasa de proliferación  $0,84 \pm 0,19$  %), mientras que las SC control seguían proliferando (Ad GFP) (tasa de proliferación  $16,57 \pm 2,57$  %) (Figuras 10.A y 10.B), lo que sugiere que la HDAC4 saca a las SC fuera del ciclo celular. Además, descubrimos que las SC infectadas con el Ad HDAC4 3SA Flag cambiaban su morfología, de SC alargadas con una morfología bipolar (Ad GFP) a una más achatada, perdiendo las formas bipolares y mostrando un núcleo agrandado (Ad HDAC4 3SA) (Figura 10.C), que recordaban a los cambios producidos por el cAMP cuando diferencia a las SC al estado pro-mielinizante (Monje et al., 2009). Para confirmar estos cambios, cuantificamos las áreas de los núcleos de las SC infectadas con el Ad GFP ( $112,41 \pm 1,71 \mu\text{m}^2$ ) y el Ad HDAC4 3SA Flag ( $186,98 \pm 2,04 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 10.D), lo que confirmaba las observaciones iniciales.

c-Jun previene la diferenciación de las SC al bloquear la expresión de *Krox20* (Parkinson et al., 2008), que es el factor de transcripción maestro, necesario y suficiente para activar el programa genético que provoca la mielinización (Topilko et al., 1994). Por ello estudiamos si aparte de bloquear la expresión de *c-Jun* la HDAC4 inducía la expresión de *Krox20* en las SC. Para ello infectamos cultivos de SC de rata con el Ad HDAC4 3SA Flag y el Ad GFP (control). A las 48 horas pos-infección cambiamos los medios por medio SATO, después incubamos durante 24 horas antes de fijar las SC con 4 % PFA y realizamos inmunofluorescencia contra Flag, GFP y *Krox20*. Nos sorprendió descubrir que la HDAC4 provocaba una elevada expresión de *Krox20* en las SC infectadas con el Ad HDAC4 3SA (Figura 10.E), lo que sugería que se estaba activando el programa transcripcional de mielinización.

Para tener una mayor comprensión de lo que estaba provocando la HDAC4, infectamos cultivos de SC de rata con el Ad HDAC4 3SA Flag y el Ad GFP (control). A las 72 horas pos-infección cambiamos los medios por medio SATO e incubamos durante 24 horas antes de recoger y procesar las SC para cuantificar por qPCR el mRNA de algunos de los reguladores genéticos positivos y negativos de la mielinización. Primero confirmamos que la HDAC4 bloquea la expresión de *c-Jun* (las SC infectadas con el Ad HDAC4 3SA Flag expresaban unos niveles de mRNA del  $38,75 \pm 12,05$  % comparadas con el control) (Figura 10.F). Después, observamos que también se reducía la expresión de los reguladores negativos de la mielinización, como *Gdnf* ( $30,5 \pm 5,61$  %), *Artemina* ( $47,0 \pm 5,43$  %), *Olig1* ( $5 \pm 1,22$  %) y *Runx2* ( $40,0 \pm 11,62$  %). Interesantemente, estos son genes que se inducen como respuesta a una lesión y están regulados por c-Jun (Arthur-Farraj et al., 2012; Arthur-Farraj et al., 2017; Fontana et al., 2012; Hung et al., 2015) (Figura 10.F). Por último, encontramos una potente inducción de la expresión de reguladores positivos de la mielinización,

como son *Krox20* ( $814,8 \pm 102,58 \%$ ), *Drp2* ( $1372,0 \pm 496,88 \%$ ) y *Prx* ( $1977,0 \pm 515,09 \%$ ) (Parkinson et al., 2003). También de *Mpz* ( $165,0 \pm 16,96 \%$ ), *Pmp22* ( $395,4 \pm 150,63 \%$ ), *Mbp* ( $112,3 \pm 4,19 \%$ ) y *Plp* ( $107,8 \pm 15,86 \%$ ) que son proteínas estructurales de la mielina (Kursula, 2008). Es más también se induce la expresión de *Hmgcr* ( $146,5 \pm 13,64 \%$ ), enzima en la ruta de la síntesis del colesterol, el lípido más abundante de la mielina (Figura 10.F). Como esperábamos, no detectamos cambios en la expresión de *Sox10* ( $95,3 \pm 12,85$ ). Con todo esto, descubrimos que la translocación nuclear de la HDAC4 es suficiente para inducir la expresión de *Krox20* y de iniciar el programa de mielinización de las SC.



**Figura 10. La translocación nuclear de la HDAC4 activa el programa de mielinización de las células de Schwann. (A)** Cultivos de SC de rata fueron infectados con Ad HDAC4 3SA Flag y Ad GFP (control). A las 48 se incubaron en medio SATO y después de 24 horas se fijaron con 4 % PFA



para realizar unas inmunofluorescencias contra Flag (verde), GFP (verde) y Ki-67 (rojo). Las flechas señalan las SC infectadas Ki-67 positivas. La barra mide 5  $\mu\text{m}$ . **(B)** Se cuantificaron 600 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Se muestra el porcentaje de SC Ki-67 positivas con respecto al total de SC infectadas. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. **(C)** La HDAC4 induce un cambio en la morfología de las SC: los mismos cultivos de SC del apartado A con sus núcleos contrastados con Hoechst. La barra mide 5  $\mu\text{m}$ . **(D)** *Tukey's box plot* del área de los núcleos de 668 SC por condición (tres diferentes experimentos de tres diferentes cultivos de SC de rata). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. **(E)** Un cultivo de SC de rata fue infectado con Ad HDAC4 3SA Flag y Ad GFP (control). Tras 48 horas se incubaron en SATO 24 horas y se fijaron con 4 % PFA. A continuación, se realizaron unas inmunofluorescencias contra Flag (verde), GFP (verde) y Krox20 (rojo). Las flechas señalan las SC infectadas. La barra mide 5  $\mu\text{m}$ . **(F)** Cultivos de SC de rata fueron infectados con los Ad HDAC4 3SA Flag y el Ad GFP (control). Tras 72 se incubaron en SATO durante 24 horas antes de recoger y procesarlas para cuantificar por qPCR el mRNA de algunos de los reguladores genéticos positivos (magentas) y negativos (rojos) de la mielinización. Sox10, al ser un marcador genérico de las SC se muestra en negro. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar de los niveles de mRNA en las SC Ad HDAC4 3SA Flag normalizados a los de las SC Ad GFP del mismo experimento ( $n = 4$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba no paramétrica y pareada, usando el test de Kolmogorov-Smirnov. En todos los *Tukey's box plot* el valor promedio está señalado mediante una "+". \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

## 8. Estudio de la expresión de las HDACs de la clase IIa en el SNP durante el desarrollo pos-embriionario y después de la lesión.

Con todos los datos *in vitro* obtenidos hasta este momento perfilamos el mecanismo molecular empleado por el cAMP para activar el programa de mielinización en las células de Schwann, que se puede resumir como sigue: la Gpr126 al incrementar los niveles de cAMP de las SC (Mogha et al., 2013; Monk et al., 2009; Monk et al., 2011) activa a la PKA (Bacallao and Monje, 2013), que por un lado inhibe las proteínas quinasas que están fosforilando a la HDAC4 (Henriksson et al., 2015; Walkinshaw et al., 2013a) y por otro lado fosforila directamente a la HDAC4 en las Ser265 y Ser266 (Liu and Schneider, 2013), provocando su disociación de la proteína 14-3-3 y su entrada al núcleo de las SC. Allí, se une al promotor de *c-Jun* y recluta a la HDAC3, mediante la formación de un complejo con NCoR1 (Fischle et al., 2002). Este complejo reprime la expresión de *c-Jun* (Parkinson et al., 2008) al desacetilar la lisina 9 de la histona 3, lo que acaba permitiendo la expresión de *Krox20* (Parkinson et al., 2004) y la activación del programa de mielinización (Figura 11.A).

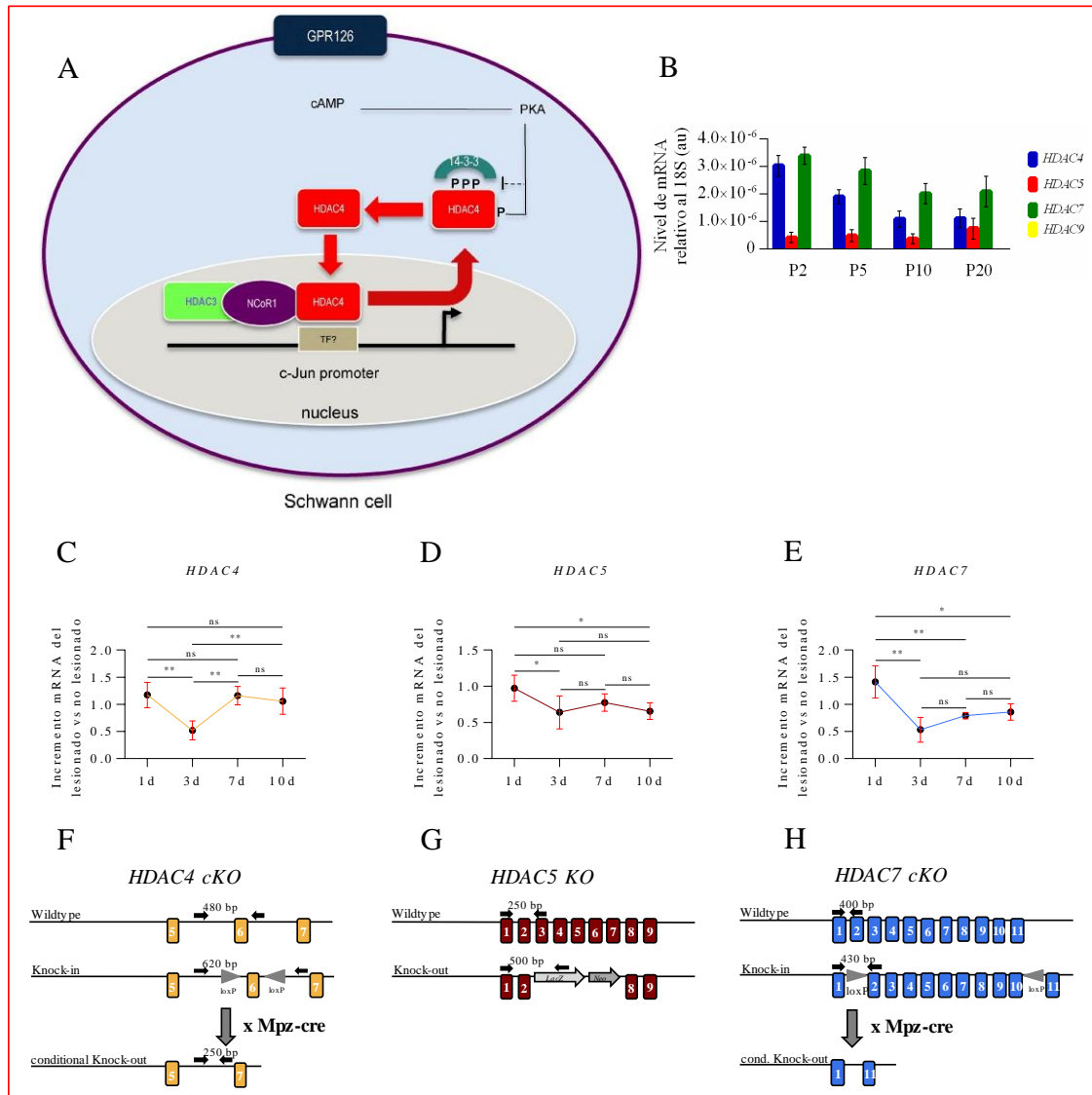
Nuestro siguiente paso fue comprobar *in vivo* si este modelo podía explicar la entrada en el programa de mielinización de las SC durante el desarrollo pos-embriionario y el de re-mielinización después de la lesión del SNP. Primero analizamos los niveles de expresión de los mRNA de las cuatro HDACs pertenecientes a la clase IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 y HDAC9) durante el desarrollo postnatal de los nervios de ratones C57BL/6J. Descubrimos que en las SC de ratón solo se expresan la HDAC7, HDAC4 y HDAC5 (por orden de nivel de mRNA normalizado al 18S), y no detectamos, mediante la qPCR, mRNA de la HDAC9 en ninguna de las muestras analizadas. Además, a P2 los niveles de mRNA de la HDAC7 y HDAC4 son los más elevados y comienzan a decrecer alcanzando a P20 los niveles más bajos. Por el contrario, los niveles de mRNA de la HDAC5 se mantienen constantes durante todo el desarrollo, incrementado ligeramente sus niveles a P20. (Figura 11.B).

Para estudiar su expresión después de la lesión, operamos ratones C57BL/6J de 8 semanas realizando un modelo de *crush*. Después sacrificamos a los ratones y extrajimos los nervios ciáticos a diferentes tiempos (1-3-7-10 días después de la

lesión). Es importante relatar que solo procesamos los primeros 8 mm desde la zona de lesión. Los niveles de expresión de las *HDACs* de la clase IIa se normalizaron con los del nervio no lesionado del mismo ratón. Descubrimos que la expresión de la *HDAC4* baja a los 3 días después de la lesión y se recuperan a los 7 días (Figura 11.C). Los niveles de expresión de la *HDAC5* bajan a los 3 días después de la lesión y se mantienen bajos, no llegando a igualarse a los niveles de los nervios no lesionados, incluso a los 10 días después de la lesión (Figura 11.D). Mientras que la expresión de la *HDAC7* sube 1 día después de la lesión, luego baja a los 3 días, y se van recuperando sus niveles lentamente hasta alcanzar los valores de los nervios no lesionados a los 10 días (Figura 11.E). Al igual que ocurre durante el desarrollo, no detectamos mRNA de la *HDAC9*.

Con estos datos de la expresión *in vivo* de las *HDACs* de la clase IIa, decidimos generar diferentes colonias de ratones modificados genéticamente en los que eliminamos la expresión de las diferentes *HDACs* de la clase IIa. Comenzamos con la *HDAC4*. La eliminación de este gen en todo el embrión (*HDAC4*<sup>-/-</sup>) es letal, muriendo el ratón a P10 a causa de una masiva osificación temprana y ectópica, consecuencia de la desrepresión de *Runx2* (Vega et al., 2004). Decidimos trabajar con la línea *Hdac4*<sup>tm2.1Eno</sup> (*HDAC4*<sup>flx/flx</sup>) generada por el profesor Eric N. Olson (Potthoff et al., 2007), la cual cruzamos con la línea *Tg(Mpz-cre)26Mes* (*Mpz-cre*<sup>+/-</sup>) (Feltri et al., 1999) para generar los ratones *cKO\_4* (*Mpz-cre*<sup>+/-</sup>; *HDAC4*<sup>flx/flx</sup>), que carecen de *HDAC4* exclusivamente en las SC a partir del E13.5 (Figura 11.F). Después expandimos la colonia de ratones *KO\_5* para la *HDAC5* (ratón *Hdac5*<sup>tm1Eno</sup> (*HDAC5*<sup>-/-</sup>) generado por el profesor Eric N. Olson (Chang et al., 2004)). La eliminación de la *HDAC5* no es letal (Figura 11.G), por lo que no necesitamos generar *cKO*. Finalmente, y puesto que la eliminación en todo el embrión de *HDAC7* es letal a E11 (Chang et al., 2006), trabajamos con la línea *Hdac7*<sup>tm2Eno</sup> (*HDAC7*<sup>flx/flx</sup>), generada por el profesor Eric N. Olson (Chang et al., 2006) la cual cruzamos con la línea *Tg(Mpz-cre)26Mes* (*Mpz-cre*<sup>+/-</sup>) (Feltri et al., 1999) para generar los ratones *cKO\_7* (*Mpz-cre*<sup>+/-</sup>; *HDAC7*<sup>flx/flx</sup>) exclusivamente en las SC a partir del E13.5 (Figura 11.H).

Las *HDAC* de clase IIa presentan un sistema muy complejo de compensación (Parra, 2015; Parra and Verdin, 2010). Para evitar este fenómeno tuvimos que desarrollar dos colonias de ratones más, un ratón *dKO*, al eliminar condicionalmente la *HDAC4* mediante el *Mpz-cre* en las SC de un ratón con un fondo genético *KO* para la *HDAC5* (*Mpz-cre*<sup>+/-</sup>; *HDAC4*<sup>flx/flx</sup>; *HDAC5*<sup>-/-</sup>), y uno *tKO*, al eliminar condicionalmente las *HDAC4* y *HDAC7* mediante el *Mpz-cre* en las SC de un ratón con un fondo genético *KO* para la *HDAC5* (*Mpz-cre*<sup>+/-</sup>; *HDAC4*<sup>flx/flx</sup>; *HDAC7*<sup>flx/flx</sup>; *HDAC5*<sup>-/-</sup>).



**Figura 11.** Estudio de la expresión de las HDACs de la clase IIa en el SNP durante el desarrollo pos-embrionario y después de la lesión. **(A)** Modelo de trabajo propuesto. La activación de la Gpr126 incrementa los niveles de cAMP intracelular en las SC, lo que produce la activación de la PKA, fosforilando a la HDAC4 en las Ser265 y Ser266. Esto (junto a otros mecanismos indirectos) produce la translocación nuclear de la HDAC4, una vez dentro del núcleo la HDAC4 se une al promotor de *c-Jun* (a través de un factor de transcripción todavía no identificado [TF]) reclutando al complejo NCoR1/HDAC3 para bloquear la expresión de *c-Jun*. **(B)** Expresión del mRNA de las HDACs de la clase IIa (*HDAC4*, *HDAC5*, *HDAC7* y *HDAC9*) en el nervio ciático de ratones C57BL/6J a diferentes tiempos del desarrollo pos-embrionario (P2, P5, P10 y P20). Se muestra la media  $\pm$  el error estándar de los niveles de mRNA normalizados al 18S (P2 n = 3; P5 n = 3; P10 n = 3; P20 n = 3). **(C-E)** Cinética de la expresión del mRNA para las HDACs de la clase IIa a diferentes tiempos (1d, 3d, 7d y 10d) después de la lesión del nervio ciático de ratones C57BL/6J. Análisis mediante qPCR de los primeros 8 mm desde la zona de lesión del nervio ciático normalizado a los valores del nervio ciático no lesionado del mismo ratón. Se representa la media  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron analizados usando un ANOVA con una prueba de múltiples comparaciones de Tukey. **(C)** *HDAC4*. **(D)** *HDAC5*. **(E)** *HDAC7*. **(F)** Estrategia para generar el ratón *cKO\_4*. **(G)** Estrategia par generar el ratón *KO\_5*. **(H)** Estrategia para generar el ratón *cKO\_7*. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

## B) Papel de las HDACs de la clase IIa en el desarrollo de la mielina in vivo.

### 9. Efectos de la eliminación de la *HDAC4* en la mielinización del SNP.

Inicialmente estudiamos el efecto de la eliminación de la HDAC4 de las células de Schwann en el genotipo *Mpz-cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup> (cKO\_4)*. Lo primero que hicimos fue confirmar mediante PCR que la enzima Cre recombinasa (*Mpz-cre<sup>+/-</sup>*) (Feltri et al., 1999) había eliminado el exón 6 floxeado de la *HDAC4* (*HDAC4<sup>flx/flx</sup>*) (Potthoff et al., 2007) en las SC del ratón *cKO\_4*. La recombinación nos permite detectar el alelo *KO* condicional al aparecer un producto de 250 pb (Figura 11.F). Para determinar la eficacia de la recombinación, extrajimos el DNA de las colas de dos ratones hermanos de camada, *cKO\_4* (*Mpz-cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>*) y control (*Mpz-cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>*), además de un ratón C57BL/6J *wild type* silvestre. También de los nervios ciáticos de los ratones *cKO\_4* y control, con los que realizamos una PCR con una pareja de oligonucleótidos específicos para detectar el alelo *KO* condicional. Como esperábamos en los DNA de las colas no detectamos el producto de 250 pb, al no expresarse la Cre recombinasa, mientras que en el DNA del nervio ciático del *cKO\_4* sí que apareció (Figura 12.A). Por lo que la estrategia empleada para eliminar condicionalmente la *HDAC4* en las SC funcionó perfectamente.

A continuación, procedimos a estudiar el proceso de mielinización durante el desarrollo postembrionario de la colonia de ratones *cKO\_4*. Para ello se extrajeron los nervios ciáticos de ratones control y *cKO\_4* hermanos de camada a P2 y P8 y se procesaron para microscopía electrónica de transmisión (Figura 12.B). Como podemos apreciar, no hay diferencias en las áreas de los nervios ciáticos a P2 ( $30.780 \pm 1.485 \mu\text{m}^2$  control vs  $31.570 \pm 846 \mu\text{m}^2$  *cKO\_4*;  $p = 0,615$ ), ni a P8 ( $75.991 \pm 3.977 \mu\text{m}^2$  control vs  $83.507 \pm 6.538 \mu\text{m}^2$  *cKO\_4*;  $p = 0,364$ ) (Figura 12.C). Interesantemente, observamos menos axones mielinizados en el *cKO\_4* a P2 ( $1.363 \pm 29$  en el control vs  $911 \pm 25$  en el *cKO\_4*;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, a P8 ya no había diferencias ( $4.717 \pm 184$  en el control vs  $4.921 \pm 236$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,523$ ) (Figura 12.D). Tampoco detectamos diferencias en el *g-ratio* de los axones mielinizados a P8 ( $0,71 \pm 0,01$  en el control vs  $0,72 \pm 0,01$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,523$ ) (Figura 12.E). Nos sorprendió, que aunque siempre cuantificamos más número de axones sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados en el *cKO\_4*, no detectamos diferencias estadísticas a P2 ( $1.077 \pm 129$  en el control vs  $1.312 \pm 78$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,146$ ), mientras que sí las detectamos a P8 ( $625 \pm 45$  axones no mielinizados control vs  $845 \pm 57$  axones no mielinizados *cKO\_4*;  $p = 0,023$ ) (Figura 12.F). Sin embargo, no observamos diferencias en el número total de axones sorteados por las SC (la suma de los axones mielinizados y los axones sorteados no mielinizados) entre el control y el *cKO\_4* a P2 ( $2.440 \pm 29$  en el control vs  $2.224 \pm 75$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,137$ ), ni a P8 ( $5.342 \pm 226$  en el control vs  $5.766 \pm 289$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,293$ ) (Figura 12.G). También cuantificamos mayor número de núcleos de SC en el *cKO\_4* a P2 ( $333 \pm 25$  núcleos en el control vs  $421 \pm 13$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,013$ ), mientras que a P8 no encontramos diferencias ( $501 \pm 42$  en el control vs  $675 \pm 59$  núcleos en el *cKO\_4*;  $p = 0,052$ ) (Figura 12.H).

Sin embargo, el número de núcleos de SC mielinizantes (mSC) no fue diferente a P2 ( $166 \pm 12$  en el control vs  $156 \pm 8$  núcleos en el *cKO\_4*;  $p = 0,463$ ), ni a P8 ( $333 \pm 24$  en el control vs  $412 \pm 25$  núcleos en el *cKO\_4*;  $p = 0,064$ ) (Figura 12.I). Por último, con respecto al porcentaje de axones mielinizados a P2 ( $56,29 \pm 3,39$  % control vs  $41,17 \pm 1,68$  % *cKO\_4*;  $p = 0,004$ ) y a P8 ( $88,35 \pm 0,41$  % control vs  $85,04 \pm 0,4$  % *cKO\_4*;  $p = 0,020$ ) hay un menor porcentajes de axones mielinizados en el *cKO\_4*

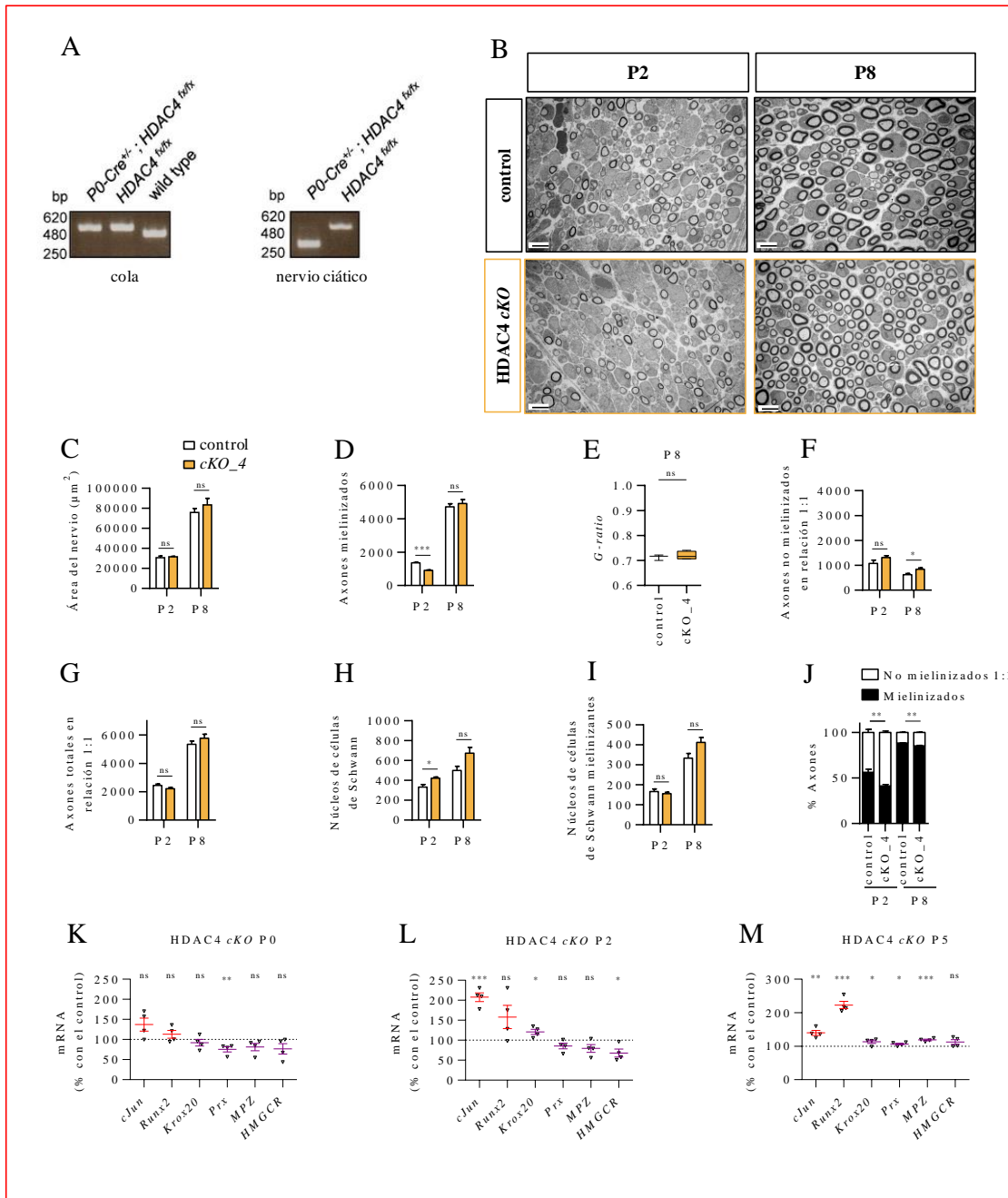
comparado con el control (Figura 12.J). En resumen, nuestros datos muestran que la eliminación *in vivo* de la *HDAC4* en las SC provoca una leve disminución del número de axones mielinizados y un incremento del número de SC a P2 que tiende a normalizarse a partir de P8.

Para consolidar la información que obtuvimos mediante la microscopía electrónica, procedimos a realizar un análisis transcripcional del mRNA de algunos de los reguladores negativos (*c-Jun* y *Runx2*) y positivos (*Krox20*, *Prx*, *Mpz* y *Hmgcr*) de la mielinización. Para ello obtuvimos los nervios ciáticos de ratones control y *cKO\_4* a P0, P2 y P5, extrajimos el RNA y cuantificamos la expresión genica mediante qPCR. Puesto que este tipo de cuantificación es relativa, los datos del *cKO\_4* se normalizaron a los del control hermano de camada. Pudimos ver como a P0 los mRNA de *c-Jun* ( $137,23 \pm 16,2$  %;  $p = 0,061$ ) y *Runx2* ( $112,99 \pm 9,6$  %;  $p = 0,225$ ) del *cKO\_4* mostraban cierta tendencia a estar ligeramente elevados respecto al control, sin embargo, los cambios no fueron estadísticamente significativos. Por su parte, *Krox20* ( $92,07 \pm 8,22$  %;  $p = 0,372$ ), *Mpz* ( $81,28 \pm 9,13$  %;  $p = 0,086$ ) y *Hmgcr* ( $76,71 \pm 13,02$  %;  $p = 0,124$ ) mostraban una tendencia a la disminución respecto al control, pero de nuevo sin ofrecer cambios estadísticamente significativos. La única diferencia estadísticamente significativa que detectamos fue la disminución en la expresión de la *Prx* ( $75,75 \pm 6,49$  %;  $p = 0,010$ ) (Figura 12.K).

A P2 vimos un aumento estadísticamente significativo en los niveles de *c-Jun* ( $207,68 \pm 10,98$  %;  $p < 0,001$ ) en el *cKO\_4*. Mientras *Runx2* mostró tendencia a mantenerse elevado ( $158,17 \pm 28,97$  %;  $p = 0,091$ ), pero no de manera estadísticamente significativa. No observamos diferencias significativas en los niveles de *Prx* ( $85,52 \pm 7,26$  %;  $p = 0,093$ ) y *Mpz* ( $79,53 \pm 9,37$  %;  $p = 0,080$ ), aunque sí cierta tendencia a estar menos expresados en el *cKO\_4*. Sin embargo, esta vez sí detectamos una disminución estadísticamente significativa en la *Hmgcr* ( $68,15 \pm 9,99$  %;  $p = 0,019$ ) (Figura 12.L), y curiosamente *Krox20* lo encontramos ligera, pero significativamente elevado ( $120,66 \pm 6,52$  %;  $p = 0,019$ ).

Por último, a P5 volvimos a ver que *c-Jun* ( $139,92 \pm 7,24$  %;  $p = 0,002$ ) y *Runx2* ( $222,87 \pm 10,9$  %;  $p < 0,001$ ) se mantenían elevados de manera significativa en el *cKO\_4*, pero el programa de mielinización parecía proceder con normalidad, atendido al nivel de expresión de los genes de la mielina (*Krox20*  $113,13 \pm 4,96$  % ( $p = 0,038$ ), *Prx*  $106,53 \pm 2,55$  %; ( $p = 0,043$ ), *Mpz*  $118,6 \pm 2,31$  % ( $p < 0,001$ ), *Hmgcr*  $112,6 \pm 7,08$  % ( $p = 0,126$ )) (Figura 12.M).

En conjunto nuestros datos hablan de que la ausencia *in vivo* de la *HDAC4* en las SC afecta al silenciamiento de reguladores negativos de la mielinización, como *c-Jun* y *Runx2*, pero el sistema es capaz de compensarse por otros mecanismos y producir una mielinización prácticamente normal.



**Figura 12. La eliminación *in vivo* de la HDAC4 en las células de Schwann disminuye el silenciamiento de reguladores negativos de la mielinización, pero no afecta a la mielinización durante el desarrollo postembrionario. (A)** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR, empleando una pareja de primers específicos para detectar el alelo recombinado, a partir del DNA de las colas y nervios ciáticos de dos ratones hermanos de camada, uno *cKO\_4* (*Mpz-cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>*) y otro control (*Mpz-cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>*). Además, se incluye para las colas un ratón *C57BL/6J* como control adicional. El producto de PCR de 250 pb es el resultado de la recombinación después de que la Cre elimine el exón 6 floxeado de la *HDAC4* (ver Figura 7.F). **(B)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de ratones control y *cKO\_4* a P2 y P8 tomadas a 3.000x. Las barras miden 5  $\mu\text{m}$ . **(C-J)** Análisis morfométrico de las imágenes de microscopía electrónica a P2 (control  $n = 4$  y *cKO\_4*  $n = 5$ ) y a P8 (control  $n = 4$  y *cKO\_4*  $n = 4$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando los ratones control y *cKO\_4* a P2 y a P8 por separado. Gráfica de barras que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(C)** Áreas totales de los nervios ciáticos de los ratones control y *cKO\_4* a P2 y a P8. **(D)** Número de axones mielinizados por nervio analizado de los ratones control y *cKO\_4* a P2 y a P8. **(E)** *Tukey's box plot* del *g-ratio* de la mielina de los axones mielinizados de los ratones control y *cKO\_4* a P8. **(F)** Número de axones sorteados y no

mielinizados por nervio analizado de los ratones control y *cKO\_4* a P2 y a P8. **(G)** Número total de axones sorteados por las SC en una relación 1:1 por nervio analizado entre los ratones control y *cKO\_4* a P2 y a P8. **(H)** Número de núcleos de SC por nervio analizado de los ratones control y *cKO\_4* a P2 y a P8. **(I)** Número de núcleos de mSC por nervio analizados entre los ratones control y *cKO\_4* a P2 y a P8. **(J)** Porcentaje de axones mielinizados por nervio analizados entre los ratones control y *cKO\_4* a P2 y a P8. **(K\_M)** Niveles de mRNA mediante qPCR de reguladores negativos (rojo) y positivos (violeta) de la mielinización de los nervios ciáticos de ratones control y *cKO\_4* a P0, P2 y P5. Gráficas de puntos  $\pm$  el error de los niveles de mRNA del *cKO\_4* normalizados a los valores del control hermano de camada de cada uno de los experimentos. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. **(K)** Niveles de los mRNAs a P0 (n = 4). **(L)** Niveles de los mRNAs a P2 (n = 4). **(M)** Niveles de los mRNAs a P5 (n = 4). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

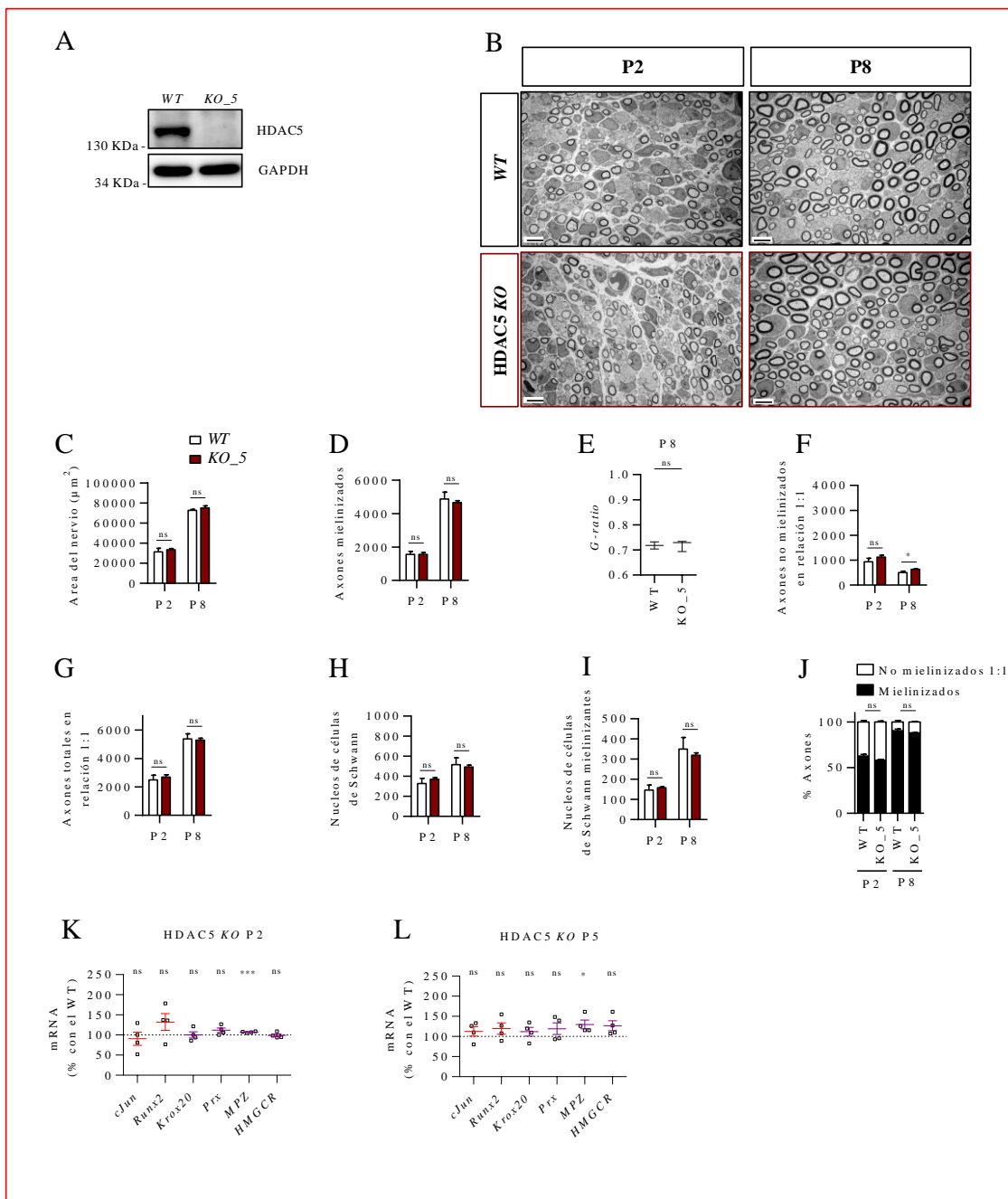
## 10. Efectos de la eliminación de la *HDAC5* en la mielinización del SNP.

Como en el caso de la colonia *cKO\_4*, lo primero que realizamos después de establecer la colonia de ratones *KO\_5* (*HDAC5*<sup>-/-</sup>) (Chang et al., 2004) fue confirmar la eliminación de la *HDAC5* en las SC. Para ello realizamos un *Western Blot* de los nervios ciáticos de un ratón *WT* y uno *KO\_5* hermano de camada (Figura 13.A). Después procedimos a estudiar el proceso de mielinización durante el desarrollo postembrionario de la colonia de ratones *KO\_5*. Para ello se extrajeron, y procesaron para microscopía electrónica de transmisión, los nervios ciáticos de ratones *WT* y *KO\_5* hermanos de camada a P2 y P8. Como podemos apreciar (Figura 13.B), no hubo diferencias en las áreas de los nervios ciáticos a P2 ( $31.502 \pm 3.344 \mu\text{m}^2$  *WT* vs  $33.609 \pm 1.085 \mu\text{m}^2$  *KO\_5*; p = 0,578), ni a P8 ( $72.831 \pm 817 \mu\text{m}^2$  *WT* vs  $75.216 \pm 2.036 \mu\text{m}^2$  *KO\_5*; p = 0,484) (Figura 13.C). No encontramos diferencias en el número de axones mielinizados a P2 ( $1.535 \pm 206$  en el *WT* vs  $1.561 \pm 110$  en el *KO\_5*; p = 0,983), ni a P8 ( $4.871 \pm 417$  en el *WT* vs  $4.660 \pm 126$  en el *KO\_5*; p = 0,543) (Figura 13.D). Tampoco detectamos diferencias en el *g-ratio* de los axones mielinizados a P8 ( $0,72 \pm 0,01$  en el *WT* vs  $0,719 \pm 0,012$  en el *KO\_5*; p = 0,962) (Figura 13.E). No había diferencias en el número de axones sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados a P2 ( $1.007 \pm 76$  en el *WT* vs  $1.126 \pm 75$  en el *KO\_5*; p = 0,308), mientras que a P8 había unos pocos más en el *KO\_5* ( $503 \pm 57$  en el *WT* vs  $632 \pm 19$  en el *KO\_5*; p = 0,044) (Figura 13.F). No encontramos diferencias en el número total de axones sorteados por las SC (la suma de los axones mielinizados y los axones sorteados no mielinizados) a P2 ( $2.542 \pm 282$  en el *WT* vs  $2.687 \pm 177$  en el *KO\_5*; p = 0,623), ni a P8 ( $5.373 \pm 57$  en el *WT* vs  $5.292 \pm 128$  en el *KO\_5*; p = 0,794) (Figura 13.G). Tampoco encontramos diferencias en el número de núcleos de SC a P2 ( $346 \pm 35$  en el *WT* vs  $370 \pm 18$  en el *KO\_5*; p = 0,489), ni a P8 ( $516 \pm 68$  en el *WT* vs  $493 \pm 19$  en el *KO\_5*; p = 0,683) (Figura 13.H). Igualmente, no encontramos diferencias en el número de núcleos de SC pertenecientes a SC mielinizantes a P2 ( $153 \pm 19$  en el *WT* vs  $158 \pm 4$  en el *KO\_5*; p = 0,665), ni a P8 ( $350 \pm 58$  en el *WT* vs  $319 \pm 12$  en el *KO\_5*; p = 0,468) (Figura 13.I). Por último, tampoco detectamos diferencias con respecto al porcentaje de axones mielinizados a P2 ( $62,85 \pm 1,49$  % *WT* vs  $58,07 \pm 1,02$  % *KO\_5*; p = 0,073), ni a P8 ( $90,64 \pm 1,69$  % *WT* vs  $88,04 \pm 0,43$  % *KO\_5*; p = 0,11) a P8 (Figura 13.J).

La conclusión de este estudio es que la eliminación *in vivo* de la *HDAC5* en las SC no afecta al proceso de mielinización durante el desarrollo postembrionario.

Para ampliar la información obtenida mediante la microscopía electrónica, procedimos a realizar un análisis transcripcional de algunos de los reguladores negativos (*c-Jun* y *Runx2*) y positivos (*Krox20*, *Prx*, *Mpz* y *Hmgcr*) de la mielinización.

Para ello extrajimos los nervios ciáticos de ratones *WT* y *KO\_5* a P2 y P5 y el mRNA de estos genes mediante qPCR, normalizando los datos del *KO* al *WT* hermano de camada. A P2 no detectamos diferencias en los niveles de los mRNA de *c-Jun* del *KO\_5* respecto al *WT* ( $90,72 \pm 16,32$  %;  $p = 0,591$ ), ni de *Runx2* ( $132,33 \pm 20,97$  %;  $p = 0,174$ ), *Krox20* ( $100,44 \pm 7,52$  %;  $p = 0,955$ ), *Prx* ( $111,44 \pm 7,52$  %;  $p = 0,084$ ), *Mpz* ( $107,28 \pm 0,86$  %;  $p < 0,001$ ) ni *Hmgcr* ( $99,19 \pm 3,42$  %;  $p = 0,819$ ) (Figura 13.K). Lo mismo ocurría a P5, donde tampoco detectamos diferencias en *c-Jun* ( $112,53 \pm 11,77$  %;  $p = 0,328$ ), *Runx2* ( $119,83 \pm 14,13$  %;  $p = 0,210$ ), *Krox20* ( $111,86 \pm 11,03$  %;  $p = 0,324$ ), *Prx* ( $119,31 \pm 14,45$  %;  $p = 0,230$ ), *Mpz* ( $129,76 \pm 10,86$  %;  $p = 0,034$ ), ni *Hmgcr* ( $126,7 \pm 12,36$  %;  $p = 0,074$ ) (Figura 13.L). Estos datos nos confirmaron que la ausencia de la *HDAC5* en las SC no afecta al programa de mielinización.





**Figura 13. La eliminación de la HDAC5 en las células de Schwann no produce efecto alguno sobre la mielinización durante el desarrollo post-embriionario.** (A) *Western blot* contra la HDAC5 de los nervios ciáticos de dos ratones de 8 semanas, *WT* y *KO\_5* (*HDAC5*<sup>-/-</sup>) (ver Figura 11.G), la *Gapdh* fue usada como control de carga. (B) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de ratones *WT* y *KO\_5* a P2 y P8 tomadas a 3.000x. Las barras miden 5  $\mu\text{m}$ . (C-J) Análisis morfométrico de las imágenes de microscopía electrónica a P2 (*WT* n = 3 y *KO\_5* n = 3) y a P8 (*WT* n = 3 y *KO\_5* n = 3). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando los ratones *WT* y *KO\_5* a P2 y a P8 por separado. Gráfica de barras que muestran la media  $\pm$  el error estándar. (C) Áreas totales de los nervios ciáticos de los ratones *WT* y *KO\_5* a P2 y a P8. (D) Número de axones mielinizados por nervio analizado de los ratones control y *cKO\_7* a P2 y a P8. (E) *Tukey's box plot* del *g-ratio* de la mielina de los axones mielinizados de los ratones *WT* y *KO\_5* a P2 y P8. (F) Número de axones sorteados y no mielinizados por nervio analizado de los ratones *WT* y *KO\_5* a P2 y a P8. (G) Número total de axones sorteados por las SC en una relación 1:1 por nervio analizado entre los ratones *WT* y *KO\_5* a P2 y a P8. (H) Número de núcleos de SC por nervio analizado de los ratones *WT* y *KO\_5* a P2 y a P8. (I) Número de núcleos de mSC por nervio analizados entre los ratones *WT* y *KO\_5* a P2 y a P8. (J) Porcentaje de axones mielinizados por nervio analizados entre los ratones *WT* y *KO\_5* a P2 y a P8. (K-L) Niveles de mRNA mediante qPCR de reguladores negativos (rojo) y positivos (violeta) de la mielinización de los nervios ciáticos de ratones control y *KO\_5* a P2 y P5. Gráficas de puntos  $\pm$  el error de los niveles de mRNA del *KO\_5* normalizados a los valores del *WT* hermano de camada de cada uno de los experimentos. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. (K) Niveles de los mRNAs a P2 (n = 4). (L) Niveles de los mRNAs a P5 (n = 4). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

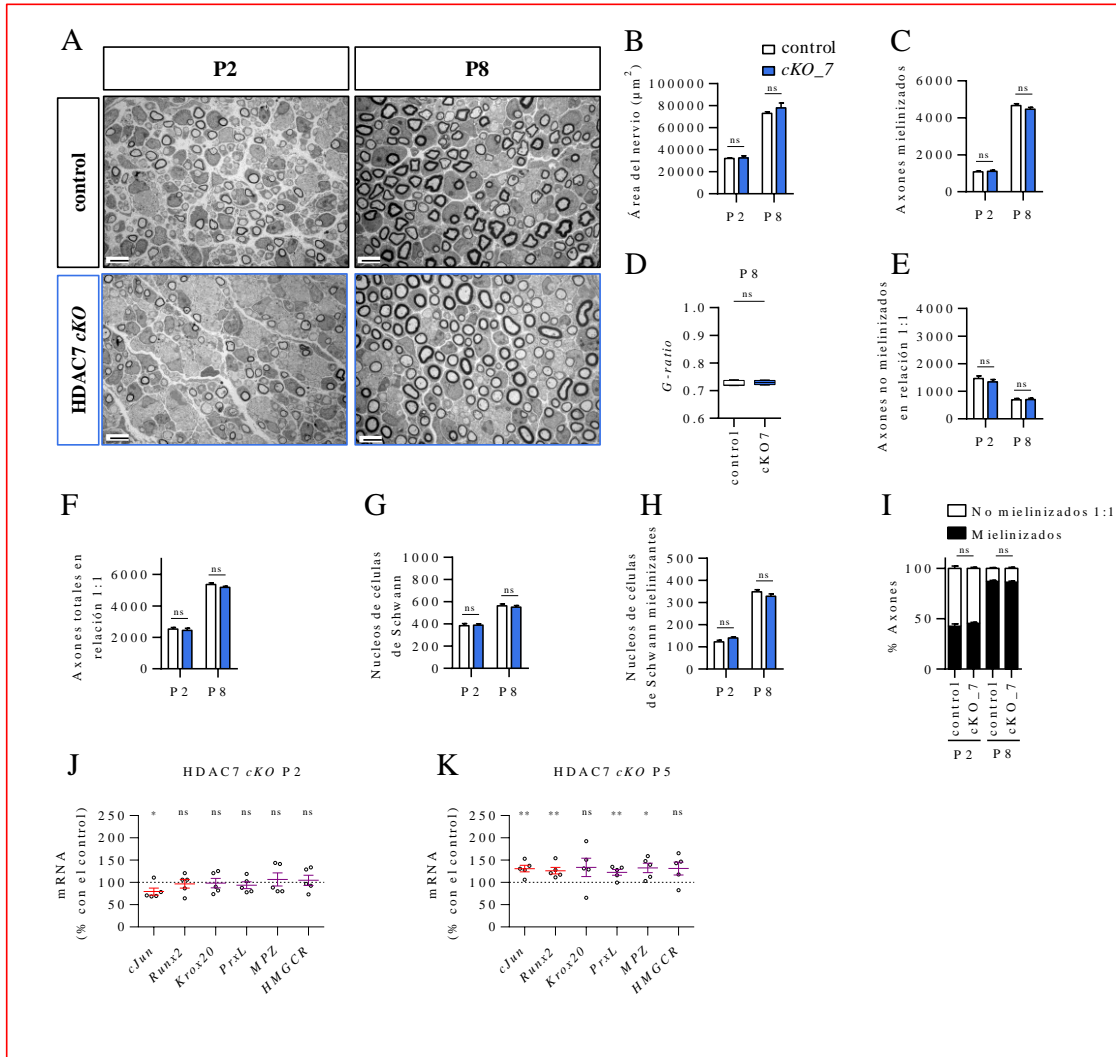
### 11. Efectos de la eliminación de la HDAC7 en la mielinización del SNP.

El último ratón que trajimos al laboratorio fue el *HDAC7*<sup>flx/flx</sup> (Azagra et al., 2016; Chang et al., 2006). Después de establecer la colonia de ratones *cKO\_7* (*Mpz-cre*<sup>+/-</sup>; *HDAC7*<sup>flx/flx</sup>) utilizamos varias aproximaciones para confirmar que la enzima Cre recombinasa (*Mpz-cre*<sup>+/-</sup>) (Feltri et al., 1999) producía la eliminación de la HDAC7 en las SC del ratón *cKO\_7*. Por desgarcia hasta el momento no hemos obtenido resultados concluyentes (ver discusión). Pero, proseguimos con la caracterización de esta nueva colonia *cKO\_7*, ya que en la bibliografía había muchas pruebas de que el ratón *HDAC7*<sup>flx/flx</sup> permitía la eliminación condicional de la HDAC7 en múltiples tipos celulares (Azagra et al., 2016; Bradley et al., 2015; Chang et al., 2006; Kasler et al., 2011; Potthoff et al., 2007; Stemig et al., 2015).

Procedimos pues a estudiar el proceso de mielinización durante el desarrollo postembrionario de la colonia de ratones *cKO\_7*. Para ello extrajimos y procesamos para microscopía electrónica de transmisión los nervios ciáticos de ratones control (*Mpz-cre*<sup>-/-</sup>; *HDAC7*<sup>flx/flx</sup>) y *cKO\_7* (*Mpz-cre*<sup>+/-</sup>; *HDAC7*<sup>flx/flx</sup>) hermanos de camada a P2 y P8. Como podemos apreciar, no hay diferencias evidentes a simple vista entre ambos ratones a P2 ni a P8 (Figura 14.A). La cuantificación mostró que no existen diferencias en las áreas de los nervios ciáticos a P2 (32.163  $\pm$  472  $\mu\text{m}^2$  control vs 32.477  $\pm$  2.098  $\mu\text{m}^2$  *cKO\_7*; p = 0,871), ni a P8 (73.089  $\pm$  2.853  $\mu\text{m}^2$  control vs 77.890  $\pm$  9.035  $\mu\text{m}^2$  *cKO\_7*; p = 0,293) (Figura 14.B), ni en el número de axones mielinizados a P2 (1.076  $\pm$  51 en el control vs 1.110  $\pm$  61 en el *cKO\_7*; p = 0,679), ni a P8 (4.663  $\pm$  96 en el control vs 4.474  $\pm$  92 en el *cKO\_7*; p = 0,205) (Figura 14.C). Tampoco detectamos diferencias en el *g-ratio* de los axones mielinizados a P8 (0,73  $\pm$  0,01 en el control vs 0,73  $\pm$  0,01 en el *cKO\_7*; p = 0,633) (Figura 14.D). No detectamos diferencias en el número de axones sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados a P2 (1.460  $\pm$  102 en el control vs 1.341  $\pm$  83 en el *cKO\_7*; p = 0,430), ni a P8 (691  $\pm$  52 en el control vs 705  $\pm$  44 en el *cKO\_7*; p = 0,851) (Figura 14.E). Ni vimos diferencias en el número total de axones sorteados por las SC (la suma de los axones mielinizados y los axones sorteados no mielinizados) a P2 (2.536  $\pm$  51 en el control vs 2.451  $\pm$  133 en

el *cKO\_7*;  $p = 0,620$ ), ni a P8 ( $5.354 \pm 101$  en el control vs  $5.178 \pm 67$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,216$ ) (Figura 14.F). Tampoco vimos diferencias en número de núcleos de SC a P2 ( $384 \pm 20$  en el control vs  $390 \pm 12$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,821$ ), ni a P8 ( $562 \pm 19$  en el control vs  $551 \pm 14$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,656$ ) (Figura 14.G). Al igual que tampoco vimos diferencias en el número de núcleos de SC pertenecientes a SC mielinizantes a P2 ( $128 \pm 6$  en el control vs  $141 \pm 5$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,105$ ), ni a P8 ( $349 \pm 9$  en el control vs  $329 \pm 10$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,183$ ) (Figura 14.H). Por último, no detectamos diferencias con respecto al porcentaje de axones mielinizados a P2 ( $42,59 \pm 2,41$  % control vs  $45,33 \pm 1,06$  % *cKO\_7*;  $p = 0,401$ ) ni a P8 ( $87,1 \pm 0,93$  % control vs  $86,37 \pm 0,94$  % *cKO\_7*;  $p = 0,605$ ) (Figura 14.I).

Para consolidar estos datos procedimos a medir los niveles del mRNA de reguladores negativos (*c-Jun* y *Runx2*) y positivos (*Krox20*, *Prx*, *Mpzy* *Hmgcr*) de la mielinización. Para ello extrajimos los nervios ciáticos de ratones control y *cKO\_7* a P2 y P5, y cauntificamos los mRNAs mediante qPCR. Los datos del *cKO\_7* se normalizaron a los del control hermano de camada. A P2 no detectamos diferencias en los niveles de los mRNA del *cKO\_7* para *Runx2* ( $96,99 \pm 9,75$  %;  $p = 0,765$ ), *Krox20* ( $98,49 \pm 10,4$  %;  $p = 0,888$ ), *Prx* ( $93,62 \pm 7,69$  %;  $p = 0,431$ ), *Mpz* ( $106,74 \pm 14,71$  %;  $p = 0,659$ ) ni *Hmgcr* ( $104,93 \pm 11,52$  %;  $p = 0,680$ ). Sorprendentemente detectamos que en el *cKO\_7* había una disminución ligera, pero significativa de los niveles de mRNA de *c-Jun* ( $79,64 \pm 7,92$  %;  $p = 0,033$ ) (Figura 14.J). Sin embargo, a P5 detectamos que en el *cKO\_7* había más *c-Jun* ( $131,15 \pm 7,55$  %;  $p = 0,003$ ) y *Runx2* ( $126,4 \pm 7,43$  %;  $p = 0,008$ ). Curiosamente también vimos subidas ligeras de *Prx* ( $122,53 \pm 6,59$  %;  $p = 0,009$ ) y *Mpz* ( $132,44 \pm 10,6$  %;  $p = 0,016$ ). Sin embargo, no encontramos diferencias en *Krox20* ( $133,89 \pm 20,6$  %;  $p = 0,139$ ) ni *Hmgcr* ( $131,18 \pm 14,39$  %;  $p = 0,062$ ) (Figura 14.K). Todas las variaciones que vimos, si bien algunas de ellas estadísticamente significativas, eran pequeñas, lo que explica que a nivel morfológico no pudieramos apreciar cambios. En conjunto los datos obtenidos de los ratones *cKO\_7* sugieren que la ausencia de la *HDAC7* en las SC no afecta de una manera obvia al programa de mielinización.



**Figura 14. La eliminación de la HDAC7 en las células de Schwann no produce efecto alguno sobre la mielinización durante el desarrollo postembrionario. (A)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de ratones control (*Mpz-cre<sup>-/-</sup> HDAC1<sup>lox/lox</sup>*) y *cKO\_7* (*Mpz-cre<sup>+/-</sup> HDAC1<sup>lox/lox</sup>*) a P2 y P8 tomadas a 3.000x. Las barras miden 5  $\mu$ m. **(B-I)** Análisis morfométrico de las imágenes de microscopía electrónica a P2 (control n = 4 y *cKO\_7* n = 3) y a P8 (control n = 5 y *cKO\_7* n = 4). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando los ratones control y *cKO\_7* a P2 y a P8 por separado. Gráfica de barras que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(B)** Áreas totales de los nervios ciáticos de los ratones control y *cKO\_7* a P2 y a P8. **(C)** Número de axones mielinizados por nervio analizado de los ratones control y *cKO\_7* a P2 y a P8. **(D)** Tukey's box plot de la *g-ratio* de la mielina de los axones mielinizados de los ratones control y *cKO\_7* a P8. **(E)** Número de axones sorteados y no mielinizados por nervio analizado de los ratones control y *cKO\_7* a P2 y a P8. **(F)** Número total de axones sorteados por las SC en una relación 1:1 por nervio analizado entre los ratones control y *cKO\_7* a P2 y a P8. **(G)** Número de núcleos de SC por nervio analizado de los ratones control y *cKO\_7* a P2 y a P8. **(H)** Número de núcleos de mSC por nervio analizados entre los ratones control y *cKO\_7* a P2 y a P8. **(I)** Porcentaje de axones mielinizados por nervio analizados entre los ratones control y *cKO\_7* a P2 y a P8. **(J-K)** Niveles de mRNA mediante qPCR de reguladores negativos (rojo) y positivos (violeta) de la mielinización de los nervios ciáticos de ratones control y *cKO\_7* a P2 y P5. Gráficas de puntos  $\pm$  el error de los niveles de mRNA del *cKO\_7* normalizados a los valores del control hermano de camada de cada uno de los experimentos. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. **(J)** Niveles de los mRNAs a P2 (n = 5). **(K)** Niveles de los mRNAs a P5 (n = 5). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

## 12. Efectos de la eliminación de las HDAC4/5 en la mielinización del SNP.

Al no ver grandes defectos en la mielinización de los ratones *cKO\_4* y *KO\_5*, y para evitar un posible proceso de compensación tras la eliminación de una sola de las HDACs de la clase IIa (Parra, 2015; Parra and Verdin, 2010) decidimos generar un colonia de ratones *cKO\_4* dentro de un fondo genético *KO\_5*. En este cruce obteníamos los ratones *dKO* (*Mpz-cre<sup>+/-</sup>*; *HDAC4<sup>flx/flx</sup>*; *HDAC5<sup>-/-</sup>*) y sus hermanos de camada control (*Mpz-cre<sup>-/-</sup>*; *HDAC4<sup>flx/flx</sup>*; *HDAC5<sup>-/-</sup>*). A continuación, procedimos a estudiar el proceso de mielinización durante el desarrollo postembrionario de la colonia de ratones *dKO*. Para ello se extrajeron y procesaron para microscopía electrónica de transmisión los nervios ciáticos de ratones controles y *dKO* hermanos de camada a P2 y P8. La cuantificación de las imágenes obtenidas mostró que no había diferencias en las áreas de los nervios ciáticos a P2 ( $31.178 \pm 2.229 \mu\text{m}^2$  control vs  $30.097 \pm 2.090 \mu\text{m}^2$  *dKO*;  $p = 0,614$ ), ni a P8 ( $70.585 \pm 1.686 \mu\text{m}^2$  control vs  $78.926 \pm 2.984 \mu\text{m}^2$  *dKO*;  $p = 0,059$ ) (Figura 15.A y B). Como se puede apreciar (Figura 15.C), a P2 los ratones controles tenían más del doble de axones mielinizados que los *dKO* ( $1.645 \pm 270$  en el control vs  $742 \pm 115$  en el *dKO*;  $p = 0,012$ ), mientras que a P8 desaparecían las diferencias entre ambos ratones ( $4.687 \pm 130$  en el control vs  $4.540 \pm 127$  en el *dKO*;  $p = 0,450$ ) (Figura 15.C). Tampoco detectamos diferencias en el *g-ratio* de los axones mielinizados a P8 ( $0,72 \pm 0,01$  en el control vs  $0,73 \pm 0,01$  en el *dKO*;  $p = 0,705$ ) (Figura 15.D). No detectamos diferencias en el número de axones sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados a P2 ( $1.132 \pm 179$  en el control vs  $1.394 \pm 220$  en el *dKO*;  $p = 0,403$ ), mientras que sí detectamos una clara disminución a P8 en el *dKO* ( $550 \pm 15$  en el control vs  $334 \pm 17$  en el *dKO*;  $p = 0,003$ ) (Figura 15.E). No vimos diferencias en el número total de axones sorteados por las SC (la suma de los axones mielinizados y los axones sorteados no mielinizados) a P2 ( $2.776 \pm 435$  en el control vs  $2.136 \pm 329$  en el *dKO*;  $p = 0,269$ ), ni a P8 ( $5.237 \pm 119$  en el control vs  $5.261 \pm 130$  en el *dKO*;  $p = 0,898$ ) (Figura 15.F). Ni vimos diferencias en el número de núcleos de SC a P2 ( $358 \pm 38$  en el control vs  $405 \pm 37$  en el *dKO*;  $p = 0,412$ ), mientras que sí vimos más núcleos de SC en el *dKO* a P8 ( $461 \pm 29$  en el control vs  $543 \pm 18$  en el *dKO*;  $p = 0,039$ ) (Figura 15.G). Sorprendentemente, no vimos diferencias significativas en el número de núcleos de las SC mielinizantes a P2 ( $143 \pm 23$  en el control vs  $118 \pm 12$  en el *dKO*;  $p = 0,354$ ), ni a P8 ( $309 \pm 21$  en el control vs  $345 \pm 23$  en el *dKO*;  $p = 0,294$ ) (Figura 15.H). Por último, a P2 ( $59,29 \pm 2,79$  % control vs  $34,9 \pm 2$  % *dKO*;  $p < 0,001$ ) y a P8 ( $89,47 \pm 0,49$  % control vs  $86,33 \pm 0,62$  % *dKO*;  $p = 0,006$ ) hay un menor porcentaje de axones mielinizados en el *dKO* comparado con el control (Figura 15.I).

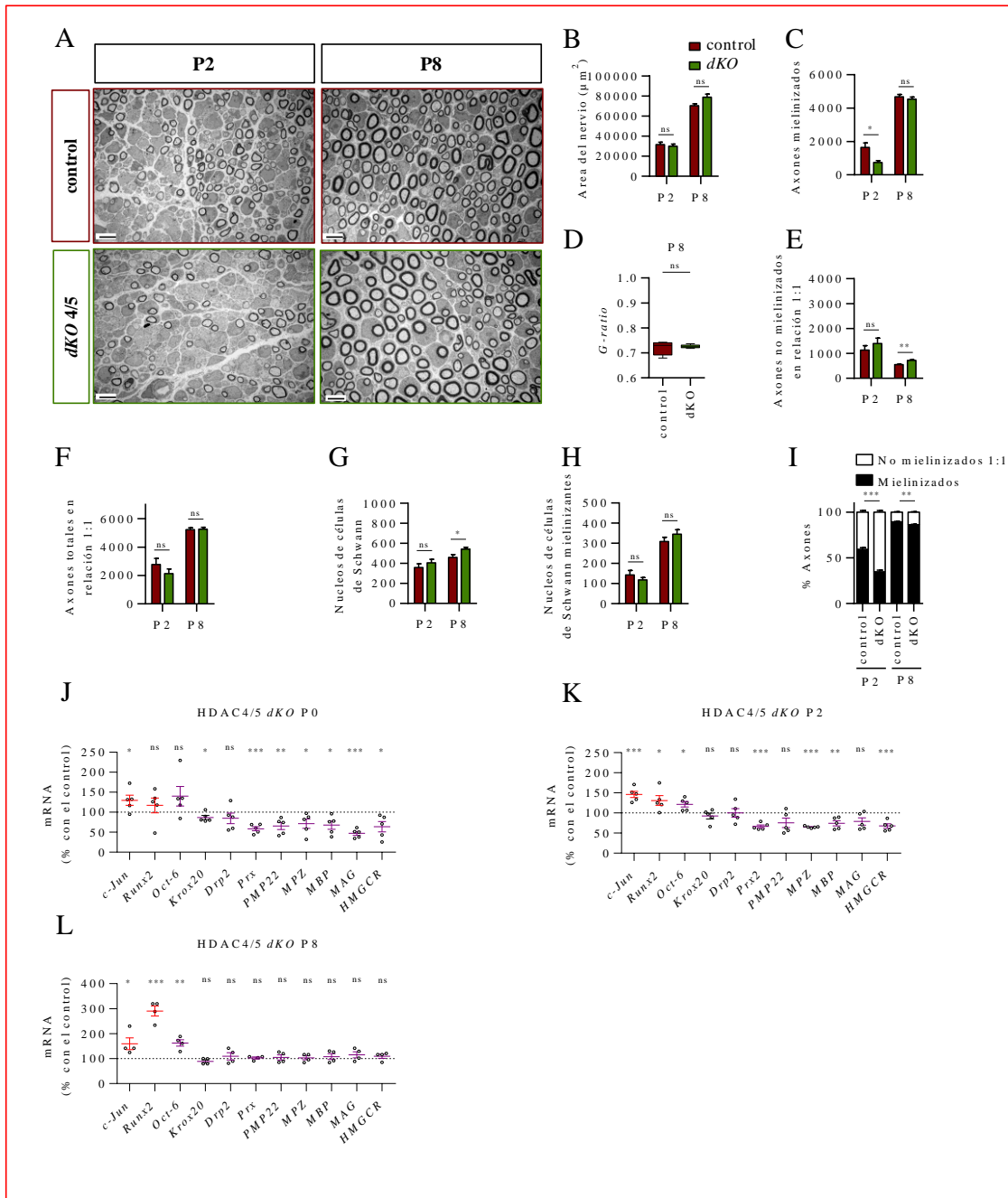
Para consolidar estos datos medimos de nuevo los niveles de mRNA para los reguladores negativos (*c-Jun* y *Runx2*) y positivos (*Oct-6*, *Krox20*, *Drp2*, *Prx*, *Pmp22*, *Mpz*, *Mbp*, *Mpz* y *Hmgcr*) de la mielinización. Para ello extrajimos los nervios ciáticos de ratones controles y *dKO* a P0, P2 y P8 y cuantificamos los mRNA mediante qPCR. Los datos del *dKO* se normalizaron frente a los del control hermano de camada. A P0 detectamos más *c-Jun* ( $129,82 \pm 12,62$  %;  $p = 0,046$ ) en el *dKO*. *Runx2* ( $117,23 \pm 18,57$  %;  $p = 0,381$ ) y *Oct-6* ( $140,04 \pm 24,18$  %;  $p = 0,136$ ) también mostraron tendencia a subir, si bien no encontramos diferencias significativas. Por otra parte, detectamos una disminución de los niveles de *Krox20* ( $86,98 \pm 5,28$  %;  $p = 0,039$ ), *Prx* ( $58,65 \pm 5,03$  %;  $p < 0,001$ ), *Pmp22* ( $65,52 \pm 8,86$  %;  $p = 0,005$ ), *Mpz* ( $71,46 \pm 11,88$  %;  $p = 0,043$ ), *Mbp* ( $67,83 \pm 10,34$  %;  $p = 0,014$ ), *Mag* ( $47,12 \pm 4,92$  %;  $p < 0,001$ ) y

*Hmgcr* ( $64,02 \pm 12,88$  %;  $p = 0,023$ ) (Figura 15.J). *Drp2* también mostró una tendencia a disminuir, pero esta no fue estadísticamente significativa ( $84,91 \pm 13,211$  %;  $p = 0,286$ ). Nuestros datos sugerían pues que, en estos ratones, un menor silenciamiento de los reguladores negativos de la mielinización (*c-Jun* y *Runx2*), provoca un retraso en la entrada de las SC en el programa de mielinización.

A P2 se mantenían elevados los niveles de *c-Jun* ( $145,95 \pm 7,66$  %;  $p < 0,001$ ) en el *dKO*. *Runx2* ( $131,03 \pm 12,19$  %;  $p = 0,034$ ) y *Oct-6* ( $121,69 \pm 6,69$  %;  $p = 0,012$ ) también mostraron incrementos estadísticamente significativos. Mientras que *Krox20* ( $92,54 \pm 7,28$  %;  $p = 0,336$ ) y *Drp2* ( $100,25 \pm 10,58$  %;  $p = 0,982$ ) del *dKO* se mantuvieron en los niveles del control. A pesar de ello *Prx* ( $66,6 \pm 11,82$  %;  $p < 0,001$ ), *Mpz* ( $65,11 \pm 1,03$  %;  $p < 0,001$ ), *Mbp* ( $74,47 \pm 6,41$  %;  $p = 0,004$ ), *Mag* ( $78,95 \pm 9,23$  %;  $p = 0,052$ ) y *Hmgcr* ( $67,73 \pm 5,59$  %;  $p < 0,001$ ) estaban claramente disminuidos (Figura 15.K). *Pmp22* mostraba tendencia a la baja, pero esta no fue estadísticamente significativa ( $75,35 \pm 11,82$  %;  $p = 0,071$ ).

Por último, aunque a P8 se encontraban notablemente elevados los niveles de *c-Jun* ( $159,42 \pm 23,85$  %;  $p = 0,047$ ), *Runx2* ( $290,54 \pm 20,12$  %;  $p < 0,001$ ) y *Oct-6* ( $162,76 \pm 12,82$  %;  $p = 0,003$ ), ya no detectamos diferencias en los niveles de *Krox20* ( $89,39 \pm 5,82$  %;  $p = 0,118$ ), *Drp2* ( $109,21 \pm 14,18$  %;  $p = 0,540$ ), *Prx* ( $102,64 \pm 3,87$  %;  $p = 0,521$ ), *Pmp22* ( $105,17 \pm 10,53$  %;  $p = 0,641$ ), *Mpz* ( $103,33 \pm 8,04$  %;  $p = 0,693$ ), *Mbp* ( $108,2 \pm 11,93$  %;  $p = 0,517$ ), *Mag* ( $115,36 \pm 12$  %;  $p = 0,248$ ) ni *Hmgcr* ( $109,43 \pm 8,3$  %;  $p = 0,299$ ).

En resumen, los datos de expresión génica nos confirmaron los resultados de la microscopía electrónica. Esto nos permite concluir que el ratón que carece de HDAC4 y HDAC5 en las células de Schwann, presenta un incremento en los reguladores negativos de la mielinización que provocan un retraso en la mielinización hasta P2. Sin embargo, a partir de P8, algún mecanismo compensatorio se activa que tiende a neutralizar los efectos de estos reguladores negativos (los cuales permanecen notablemente elevados) y el desarrollo de la mielina vuelve a la normalidad.



**Figura 15. La eliminación simultánea de las HDAC4 y HDAC5 en las células de Schwann retrasa el proceso de mielinización durante el desarrollo postembrionario. (A)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de ratones control (*Mpz-cre<sup>-/-</sup>*; *HDAC4<sup>flx/flx</sup>*; *HDAC5<sup>-/-</sup>*) y *dKO* (*Mpz-cre<sup>+/-</sup>*; *HDAC4<sup>flx/flx</sup>*; *HDAC5<sup>-/-</sup>*) a P2 y P8 tomadas a 3.000x. Las barras miden 5 μm. **(B-I)** Análisis morfológico de las imágenes de microscopía electrónica a P2 (control n = 4 y *dKO* n = 5) y a P8 (control n = 4 y *dKO* n = 5). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando los ratones control y *dKO* a P2 y a P8 por separado. Gráfica de barras que muestran la media ± el error estándar. **(B)** Áreas totales de los nervios ciáticos de los ratones control y *dKO* a P2 y a P8. **(C)** Número de axones mielinizados por nervio analizado de los ratones control y *dKO* a P2 y a P8. **(D)** Tukey's box plot del *g*-ratio de la mielina de los axones mielinizados de los ratones control y *dKO* a P8. **(E)** Número de axones sorteados y no mielinizados por nervio analizado de los ratones control y *dKO* a P2 y a P8. **(F)** Número total de axones sorteados por las SC en una relación 1:1 por nervio analizado entre los ratones control y *dKO* a P2 y a P8. **(G)** Número de núcleos de SC por nervio analizado de los ratones control y *dKO* a P2 y a P8. **(H)** Número de núcleos de mSC por nervio analizados entre los ratones control y *dKO* a P2 y a P8. **(I)** Porcentaje de axones mielinizados por nervio analizados entre los

ratones control y *dKO* a P2 y a P8. **(J\_L)** Niveles de mRNA mediante qPCR de reguladores negativos (rojo) y positivos (violeta) de la mielinización de los nervios ciáticos de ratones control y *dKO* a P0, P2 y P5. Gráficas de puntos  $\pm$  el error de los niveles de mRNA del *dKO* normalizados a los valores del control hermano de camada de cada uno de los experimentos. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. **(J)** Niveles de los mRNAs a P0 (n = 5). **(K)** Niveles de los mRNAs a P2 (n = 5). **(L)** Niveles de los mRNAs a P8 (n = 4). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

### 13. Efectos de la eliminación de las *HDAC4/5/7* en la mielinización del SNP.

Como ya he indicado antes, las células de Schwann expresan la *HDAC7*, la cual podría compensar la ausencia de las *HDAC4* y *HDAC5*. Puesto que la eliminación de la *HDAC4* y la *HDAC5* en el ratón *dKO* causaba un retraso en el inicio de la mielinización, pero no un bloqueo total, decidimos generar una línea de ratones *tKO*. Procedimos a continuación a estudiar el proceso de mielinización durante el desarrollo postembrionario de estos ratones *tKO*. La ultraestructura de los nervios ciáticos de los ratones control (*Mpz-cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>; HDAC7<sup>flx/flx</sup>*) y *tKO* (*Mpz-cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>; HDAC7<sup>flx/flx</sup>*) hermanos de camada a P2, P8 y P21 se determinó mediante ME de transmisión. A P21 el experimento no está completado, solo hay datos de 2 ratones controles y 4 *tKO*, por eso no hay estadística.

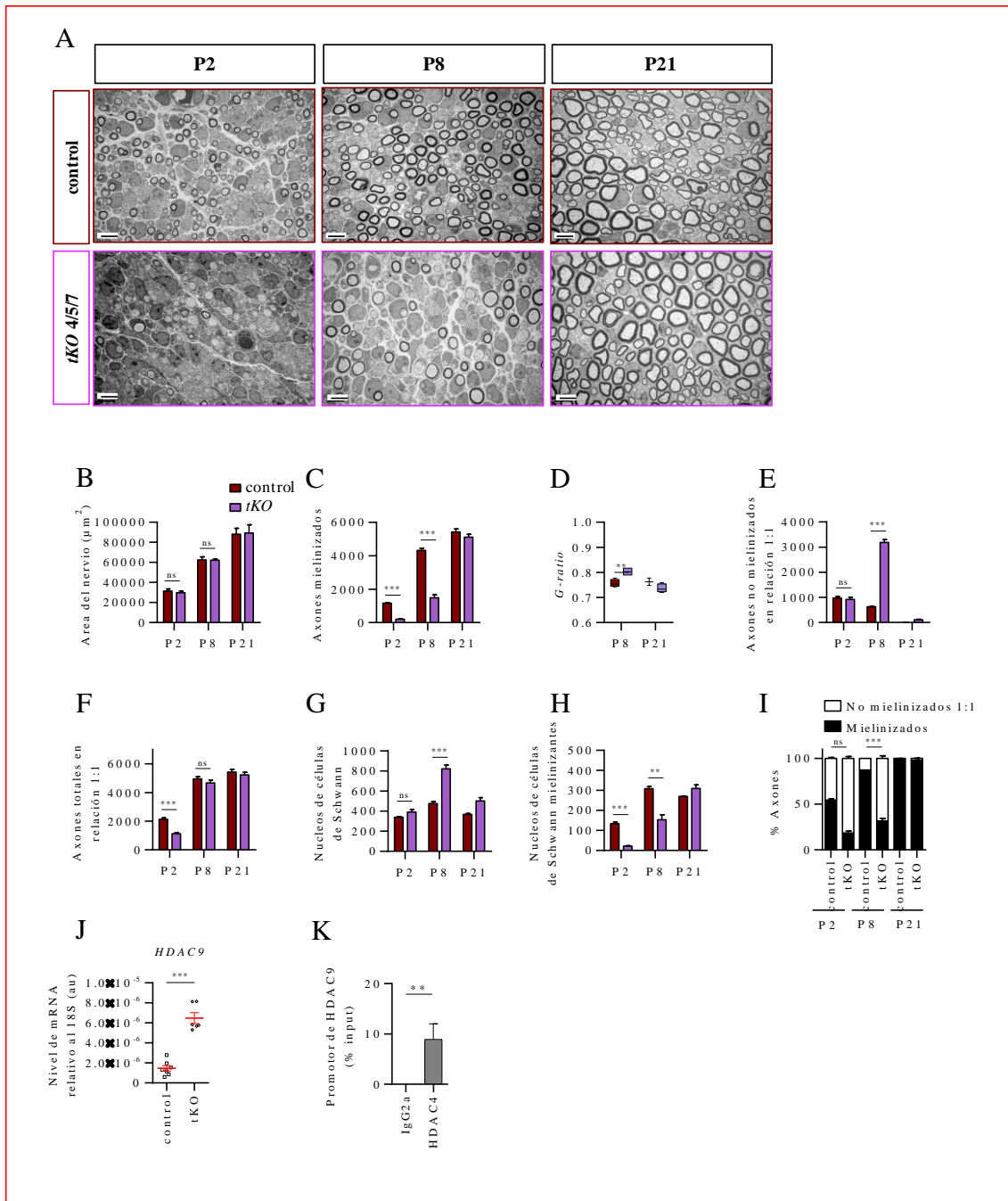
No hubo diferencias en las áreas de los nervios ciáticos a P2 ( $31.506 \pm 1.908 \mu\text{m}^2$  control vs  $29.689 \pm 1.659 \mu\text{m}^2$  *tKO*; p = 0,523), ni a P8 ( $62.480 \pm 3.070 \mu\text{m}^2$  control vs  $62.166 \pm 1.283 \mu\text{m}^2$  *tKO*; p = 0,928). Tampoco parece que vaya a haberlas a P21 ( $88.087 \pm 5.857 \mu\text{m}^2$  control vs  $89.401 \pm 8.131 \mu\text{m}^2$  *tKO*) (Figura 16.B). Como se puede apreciar, a P2 los ratones *tKO* tienen muchos menos axones mielinizados que los controles ( $1.160 \pm 29$  en el control vs  $208 \pm 24$  en el *tKO*; p < 0,001) (Figura 16.C). Lo mismo ocurre a P8 ( $4.325 \pm 129$  en el control vs  $1.487 \pm 179$  en el *tKO*; p < 0,001). Sin embargo, a P21 las diferencias entre ambos ratones tienden a desaparecer ( $5.426 \pm 191$  en el control vs  $5.119 \pm 172$  en el *tKO*). También detectamos diferencias en el *g-ratio* de los axones mielinizados a P8 ( $0,76 \pm 0,01$  en el control vs  $0,8 \pm 0,01$  en el *tKO*; p = 0,005), mientras que a P21 el *g-ratio* del *tKO* tiende a normalizarse ( $0,76 \pm 0,01$  en el control vs  $0,74 \pm 0,01$  en el *tKO*) (Figura 16.D). No detectamos diferencias en el número de axones sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados a P2 ( $971 \pm 67$  en el control vs  $920 \pm 84$  en el *tKO*; p = 0,652), mientras que sí detectamos más axones sorteados no mielinizados a P8 en el *tKO* comparado con en el control ( $628 \pm 21$  en el control vs  $3.187 \pm 111$  en el *tKO*; p < 0,001). Las diferencias en el número de axones no mielinizados entre el *tKO* y el control tienden a mantenerse a P21 ( $8 \pm 4$  en el control vs  $110 \pm 20$  en el *tKO*) (Figura 16.E). Vimos diferencias en el número total de axones sorteados por las SC (la suma de los axones mielinizados y los axones sorteados no mielinizados) a P2 ( $2.131 \pm 95$  en el control vs  $1.128 \pm 91$  en el *tKO*; p < 0,001), a P8 ( $4.953 \pm$  en el control vs  $4.674 \pm 188$  axones en el *tKO*; p = 0,300), mientras que a P21 las diferencias entre ambos genotipos tienden a desaparecer ( $5.434 \pm 195$  en el control vs  $5.086 \pm 128$  axones en el *tKO*) (Figura 16.F). No vimos diferencias en el número de núcleos de SC a P2 ( $340 \pm 8$  en el control vs  $391 \pm 26$  en el *tKO*; p = 0,083), mientras que sí vimos más núcleos de SC en el *tKO* a P8 ( $476 \pm 20$  en el control vs  $823 \pm 37$  en el *tKO*; p < 0,001), y a P21 parece se mantiene la tendencia ( $368 \pm 9$  en el control vs  $503 \pm 32$  en el *tKO*) (Figura 16.G). Detectamos menos núcleos pertenecientes a SC mielinizantes en el ratón *tKO* a P2 ( $134 \pm 8$  en el control vs  $22 \pm 1$  en el *tKO*; p < 0,001), y a P8 ( $308 \pm 11$  en el control vs

153 ± 25 en el *tKO*; p = 0,001), mientras que a P21 parece no haber diferencia (270 ± 2 en el control vs 310 ± 25 en el *tKO*) (Figura 16.H). Por último, a P2 (54,59 ± 1,13 % control vs 18,54 ± 2,12 % *tKO*; p < 0,001) y a P8 (87,33 ± 0,09 % control vs 31,59 ± 2,87 % *tKO*; p < 0,001) hay menos porcentaje de axones mielinizados en el *tKO* comparado con el control (Figura 16.I).

Tomados en conjunto, nuestros datos demuestran que la eliminación simultánea *in vivo* de la *HDAC4*, la *HDAC5* y la *HDAC7* en las SC, magnifica el retraso en la mielinización que ya vimos en la línea de ratones *dKO*, aunque no la bloquea del todo. El *tKO* al final sigue alcanzando una mielinización aparentemente normal debido a que en las células de Schwann se está expresando la *HDAC9* ( $1,46 \times 10^{-6} \pm 2,76 \times 10^{-7}$  au control vs  $6,48 \times 10^{-6} \pm 5,33 \times 10^{-6}$  fc *tKO*; p < 0,001) (Figura 16.J), la cual compensa la ausencia de las otras tres HDACs de la clase IIa.

La *HDAC4* en condiciones normales bloquea la expresión de la *HDAC9* a través de su unión a Mef2 en el promotor de la *HDAC9* (Haberland et al., 2007). Para confirmar esta interacción de la *HDAC4* con el promotor de la *HDAC9* en las células de Schwann realizamos qPCRs del promotor de la *HDAC9* de las muestras de ChIPs de la *HDAC4* en los cultivos de SC de rata tratados 24 horas con 1 mM dbcAMP (ver capítulo 5 de los resultados). Descubrimos que la *HDAC4* se encuentra unida al promotor de la *HDAC9* (8,9 ± 0,37 % del *input*), mientras que apenas se recuperó *input* con la IgG (0,02 ± 0,01 % del *input*), (Figura 16.K).





**Figura 16. La eliminación simultánea de las HDAC4, HDAC5 y HDAC7 en las células de Schwann retrasa el proceso de mielinización durante el desarrollo post-embriónico. (A)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de ratones control (*Mpz-cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>; HDAC7<sup>-/-</sup>*) y *tKO* (*Mpz-cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>; HDAC7<sup>-/-</sup>*) a P2, P8 y P21 tomadas a 3.000x. Las barras miden 5 μm. **(B-I)** Análisis morfométrico de las imágenes de microscopía electrónica a P2 (control n = 4 y *tKO* n = 3), a P8 (control n = 4 y *tKO* n = 4), y a P21 (control n = 2 y *tKO* n = 4). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando los ratones control y *tKO* a P2 y a P8 por separado. Gráfica de barras que muestran la media ± el error estándar. **(B)** Áreas totales de los nervios ciáticos de los ratones control y *tKO* a P2, a P8 y a P21. **(C)** Número de axones mielinizados por nervio analizado de los ratones control y *tKO* a P2, a P8 y a P21. **(D)** *Tukey's box plot* del g-ratio de la mielina de los axones mielinizados de los ratones control y *tKO* a P8 y a P21. **(E)** Número de axones sorteados y no mielinizados por nervio analizado de los ratones control y *tKO* a P2, a P8 y a P21. **(F)** Número total de axones sorteados por las SC en una relación 1:1 por nervio analizado entre los ratones control y *tKO* a P2, a P8 y a P21. **(G)** Número de núcleos de SC por nervio analizado de los ratones control y *tKO* a P2, a P8 y a P21. **(H)** Número de núcleos de mSC por nervio analizados entre los ratones control y *tKO* a P2, a P8 y a P21. **(I)** Porcentaje de axones mielinizados por nervio analizados entre los ratones

control y *tKO* a P2, a P8 y a P21. **(J)** Análisis transcripcional de los niveles de mRNA mediante qPCR de *HDAC9* de los nervios ciáticos *UI* de ratones control ( $n = 7$ ) y *tKO* ( $n = 6$ ) de 8 semanas. Gráficas de puntos  $\pm$  el error. **(K)** Incubamos durante 24 horas cultivos de SC de rata con SATO 1 mM dbcAMP, después realizamos el cross-linked con 1 % PFA y recogimos las SC para realizar los experimentos de ChIP empleando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-*HDAC4* o una IgG de ratón no específica (ChIP grade). Se realizaron qPCRs empleado primers específicos de la región promotora de *HDAC9*, los valores de las qPCRs de los precipitados se normalizo al valor del *input* de la cromatina de cada uno de los experimentos. Se muestra la media  $\pm$  el error mediante una gráfica de barras ( $n = 5$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas, (control  $n = 5$  y *tKO*  $n = 5$ ). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

### C) Papel de las HDACs IIa en la regeneración y la re-mielinización del SNP después de la lesión.

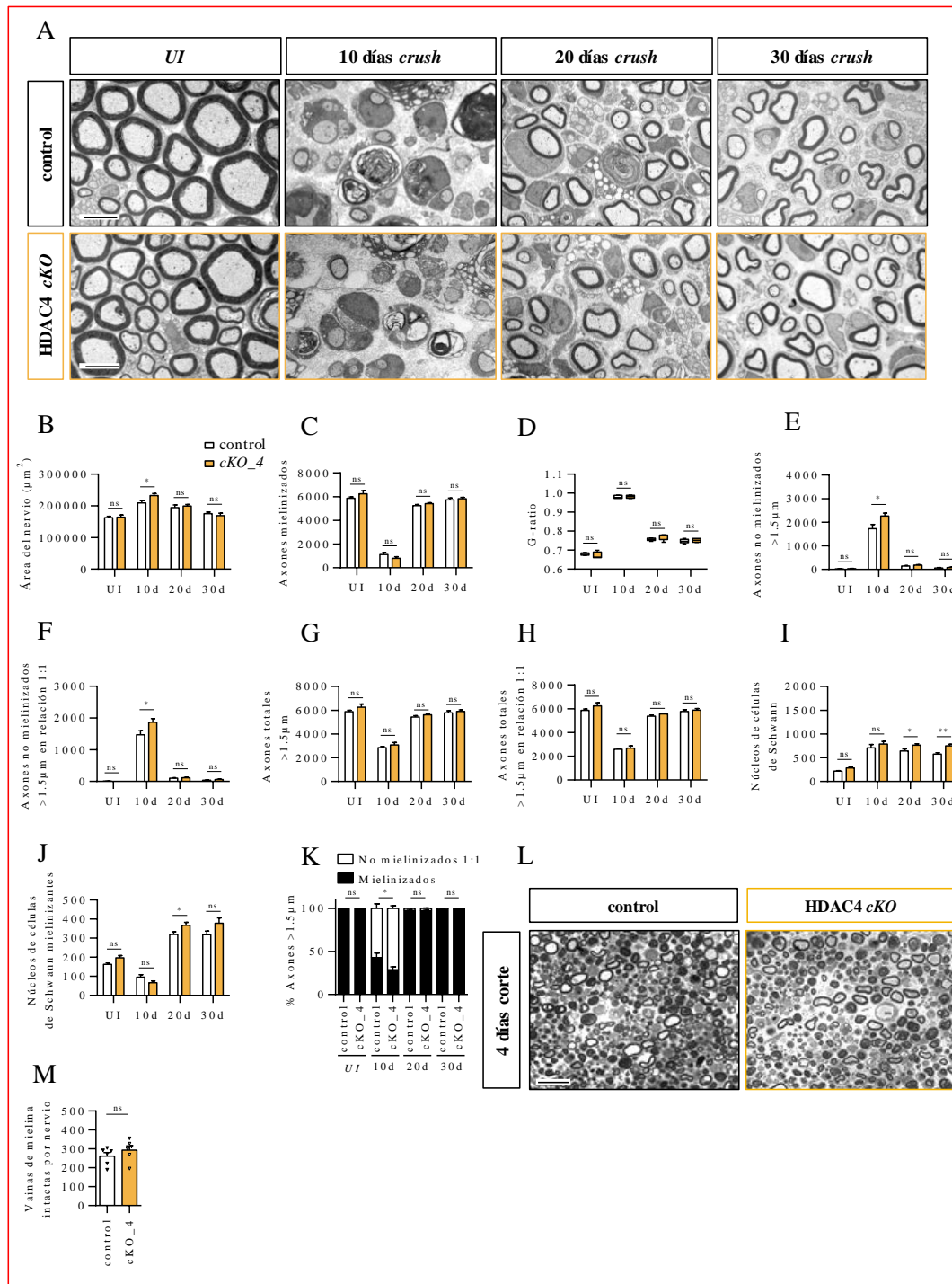
#### 14. Efectos de la eliminación de la *HDAC4* en la re-mielinización del SNP después de la lesión.

Como resultado de todos los datos *in vitro* e *in vivo* acumulados sobre la importancia de la *HDAC4* en la biología de las células de Schwann, decidimos estudiar cuál era su relevancia en la regeneración y la re-mielinización del SNP después de la lesión. Aunque a P2 había diferencias entre los ratones control (*P0-Cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>*) y *cKO\_4* (*P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>*) (ver Figura 12), comprobamos que en los ratones adultos de 9 semanas y media (P66) no había diferencias en el número de axones y el grado de mielinización de estos (ver los *UI* de control y *cKO\_4* en la Figura 17), lo que nos permitió *in vivo* estudiar la cinética de la regeneración y la re-mielinización axonal a diferentes tiempos después de lesionar los nervios ciáticos de ratones control y *cKO\_4*. Primero estudiamos si la eliminación *in vivo* de la *HDAC4* había causado alteraciones en la activación de la degeneración Walleriana después de producirse la lesión, lo que podría producir una alteración en la capacidad de eliminación de los restos del tejido dañado que acabaría produciendo una alteración en la regeneración axonal y la re-mielización. Para ello empleamos ratones de la colonia *cKO\_4* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a una operación para cortar el nervio ciático. Cuatro días después de la operación los ratones fueron sacrificados y los nervios ciáticos cortados fueron expuestos y fijados durante 15 minutos antes de ser extraídos y procesados para microscopía electrónica de transmisión. Se cuantificó el número de vainas de mielina intactas de un único corte transversal dentro del muñón distal a 5 mm de la zona de lesión por ratón (teñido con azul de toluidina) mediante microscopía óptica a 63x. Como podemos ver, no hay diferencias en la activación de la degeneración Walleriana (Figura 17.L) ( $262 \pm 19$  vainas de mielina intactas en el control vs  $294 \pm 23$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,311$ ) (Figura 17.M). Por lo que la eliminación *in vivo* de la *HDAC4* no afecta a la degeneración Walleriana.

Después, procedimos a estudiar el proceso de re-mielinización. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *cKO\_4* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a una operación para lesionar el nervio ciático (mediante un modelo de *crush*). A diferentes tiempos después de la lesión (10, 20 y 30 días) los ratones fueron sacrificados y sus nervios ciáticos no lesionados (*UI*) y lesionados procesados para microscopía electrónica de transmisión. No se apreciaron diferencias en las áreas de los nervios ciáticos *UI* ( $163.055 \pm 3.808 \mu\text{m}^2$  control vs  $164.192 \pm 7.212 \mu\text{m}^2$  *cKO\_4*;  $p = 0,894$ ). Sin embargo, a los 10 días después de la lesión, las

áreas de los *cKO\_4* fueron un poco más grandes que las de los controles ( $216.604 \pm 10.453 \mu\text{m}^2$  control vs  $232.561 \pm 6.377 \mu\text{m}^2$  *cKO\_4*;  $p = 0,037$ ). Las diferencias en las áreas de los nervios ciáticos desaparecen a los 20 días después de la lesión ( $194.551 \pm 8.453 \mu\text{m}^2$  control vs  $199.290 \pm 5.185 \mu\text{m}^2$  *cKO\_4*;  $p = 0,646$ ), manteniéndose igualadas al menos hasta los 30 días después de la lesión ( $175.697 \pm 4.728 \mu\text{m}^2$  control vs  $168.893 \pm 7.677 \mu\text{m}^2$  *cKO\_4*;  $p = 0,456$ ) (Figura 17.B). No hubo diferencias en el número de axones mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $5.855 \pm 115$  en el control vs  $6.233 \pm 261$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,234$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $1.113 \pm 165$  en el control vs  $807 \pm 125$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,153$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $5.245 \pm 96$  en el control vs  $5.416 \pm 65$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,174$ ), ni tampoco a los 30 días después de la lesión ( $5.731 \pm 150$  en el control vs  $5.826 \pm 110$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,644$ ) (Figura 17.C). Tampoco detectamos diferencias en el *g-ratio* de los axones mielinizados de los nervios ciáticos *UI* ( $0,68 \pm 0,01$  en el control vs  $0,67 \pm 0,01$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,473$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $0,98 \pm 0,01$  en el control vs  $0,98 \pm 0,01$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,744$ ), a los 20 días después de la lesión ( $0,76 \pm 0,01$  en el control vs  $0,77 \pm 0,01$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,155$ ), ni tampoco a los 30 días después de la lesión ( $0,75 \pm 0,01$  en el control vs  $0,75 \pm 0,01$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,569$ ) (Figura 17.D). No detectamos diferencias en el número de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC no mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $21 \pm 8$  en el control vs  $30 \pm 10$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,525$ ). Sin embargo a los 10 días después de la lesión, este número fue mayor en el *cKO\_4* ( $1.730 \pm 175$  en el control vs  $2.266 \pm 116$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,024$ ), mientras que no hubo diferencias a los 20 días después de la lesión ( $181 \pm 34$  en el control vs  $209 \pm 34$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,350$ ), ni tampoco a los 30 días después de la lesión ( $63 \pm$  en el control vs  $81 \pm 21$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,485$ ) (Figura 17.E). Tampoco detectamos diferencias en el número de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $8 \pm 2$  en el control vs  $2 \pm 1$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,216$ ). A 10 días después de la lesión el número de estos axones en los nervios ciáticos del *cKO\_4* es mayor que en el control ( $1.472 \pm 130$  en el control vs  $1.869 \pm 115$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,047$ ), mientras que no hubo diferencias a los 20 días después de la lesión ( $123 \pm 20$  en el control vs  $142 \pm 20$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,650$ ), ni tampoco a los 30 días después de la lesión ( $38 \pm 9$  en el control vs  $58 \pm 16$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,292$ ) (Figura 17.F). No detectamos diferencias en el número total de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC en los nervios ciáticos *UI* ( $5.876 \pm 121$  en el control vs  $6.263 \pm 263$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,231$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $2.843 \pm$  en el control vs  $3.073 \pm 204$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,398$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $5.426 \pm 111$  en el control vs  $5.626 \pm 60$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,152$ ), ni tampoco a los 30 días después de la lesión ( $5.794 \pm 163$  en el control vs  $5.908 \pm 128$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,616$ ) (Figura 17.G). Tampoco detectamos diferencias en el número total de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) (es la suma del número de axones mielinizados y sorteados de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro, en una relación 1:1 y los no mielinizados) en los nervios ciáticos *UI* ( $5.863 \pm 115$  en el control vs  $6.235 \pm 261$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,240$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $2.585 \pm 86$  en el control vs  $2.675 \pm 540$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,731$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $5.368 \pm 102$  en el control vs  $5.558 \pm 54$  *cKO\_4*;  $p = 0,138$ ), ni tampoco a los 30 días después de la lesión ( $5.769 \pm 155$  en el control vs  $5.884 \pm 122$  en el *cKO\_4*;  $p =$

0,594) (Figura 17.H). No detectamos diferencias en el número de núcleos de SC en los nervios ciáticos *UI* ( $221 \pm 10$  en el control vs  $283 \pm 25$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,059$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $707 \pm 72$  en el control vs  $788 \pm 52$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,195$ ), mientras que a los 20 y a los 30 días después de la lesión detectamos un mayor número de núcleos de SC en los nervios ciáticos de los ratones *cKO\_4* ( $644 \pm 41$  en el control vs  $764 \pm 28$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,041$  a 20 días y  $575 \pm 32$  en el control vs  $752 \pm 34$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,007$  a 30 días después de la lesión) (Figura 17.I). No detectamos diferencias en el número de núcleos de SC pertenecientes a SC mielinizantes en los nervios ciáticos *UI* ( $162 \pm 7$  en el control vs  $197 \pm 12$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,053$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $96 \pm 12$  en el control vs  $66 \pm 10$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,087$ ), mientras que a los 20 días después de la lesión detectamos mayor número de núcleos en los *cKO\_4* ( $323 \pm 13$  en el control vs  $368 \pm 15$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,045$ ). Estos valores se normalizaban a los 30 días después de la lesión ( $318 \pm 19$  en el control vs  $378 \pm 28$  en el *cKO\_4*;  $p = 0,111$ ) (Figura 17.J). Por último, no detectamos diferencias con respecto al porcentaje de axones mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $99,87 \pm 0,03$  % control vs  $99,97 \pm 0,01$  % *cKO\_4*;  $p = 0,058$ ). Sin embargo, a los 10 días después de la lesión detectamos un menor porcentaje de los axones mielinizados en el *cKO\_4* ( $42,83 \pm 5,43$  % control vs  $29,34 \pm 2,74$  % *cKO\_4*;  $p = 0,047$ ). Estas diferencias desaparecían a los 20 días después de la lesión ( $97,71 \pm 0,37$  % control vs  $97,45 \pm 0,56$  % *cKO\_4*;  $p = 0,705$ ), siendo también normales los valores a los 30 días después de la lesión ( $99,34 \pm 0,14$  % control vs  $99,03 \pm 0,26$  % *cKO\_4*;  $p = 0,301$ ) (Figura 17.K). Concluimos pues que la eliminación *in vivo* de la *HDAC4* en las SC tras la lesión retrasa ligeramente el proceso de re-mielinización de los nervios periféricos.



**Figura 17.** La eliminación *in vivo* de la *HDAC4* en las células de Schwann retrasa ligeramente la re-mielinización después de la lesión del nervio ciático. **(A)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los nervios ciáticos de ratones control ( $P0-Cre^{-/-}; HDAC4^{flx/flx}$ ) y  $cKO_4$  ( $P0-Cre^{+/+}; HDAC4^{flx/flx}$ ) UI y 10\_20\_30 días después de la lesión tomadas a 3.000x. Las barras miden 5 µm. **(B-K)** Análisis morfométrico de las imágenes de microscopía electrónica de los nervios ciáticos UI (control  $n = 4$  y  $cKO_4$   $n = 4$ ), 10 días (control  $n = 5$  y  $cKO_4$   $n = 7$ ), 20 días (control  $n = 5$  y  $cKO_4$   $n = 5$ ) y 30 días después de la lesión (control  $n = 5$  y  $cKO_4$   $n = 4$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando los nervios ciáticos de los ratones control y  $cKO_4$  UI, 10 días, 20 días y 30 días después de la lesión por separado. Gáfica de barras que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(B)** Áreas totales de los nervios ciáticos UI y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y  $cKO_4$ . **(C)** Número de axones mielinizados por nervio ciático analizado UI y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y  $cKO_4$ . **(D)** Tukey's

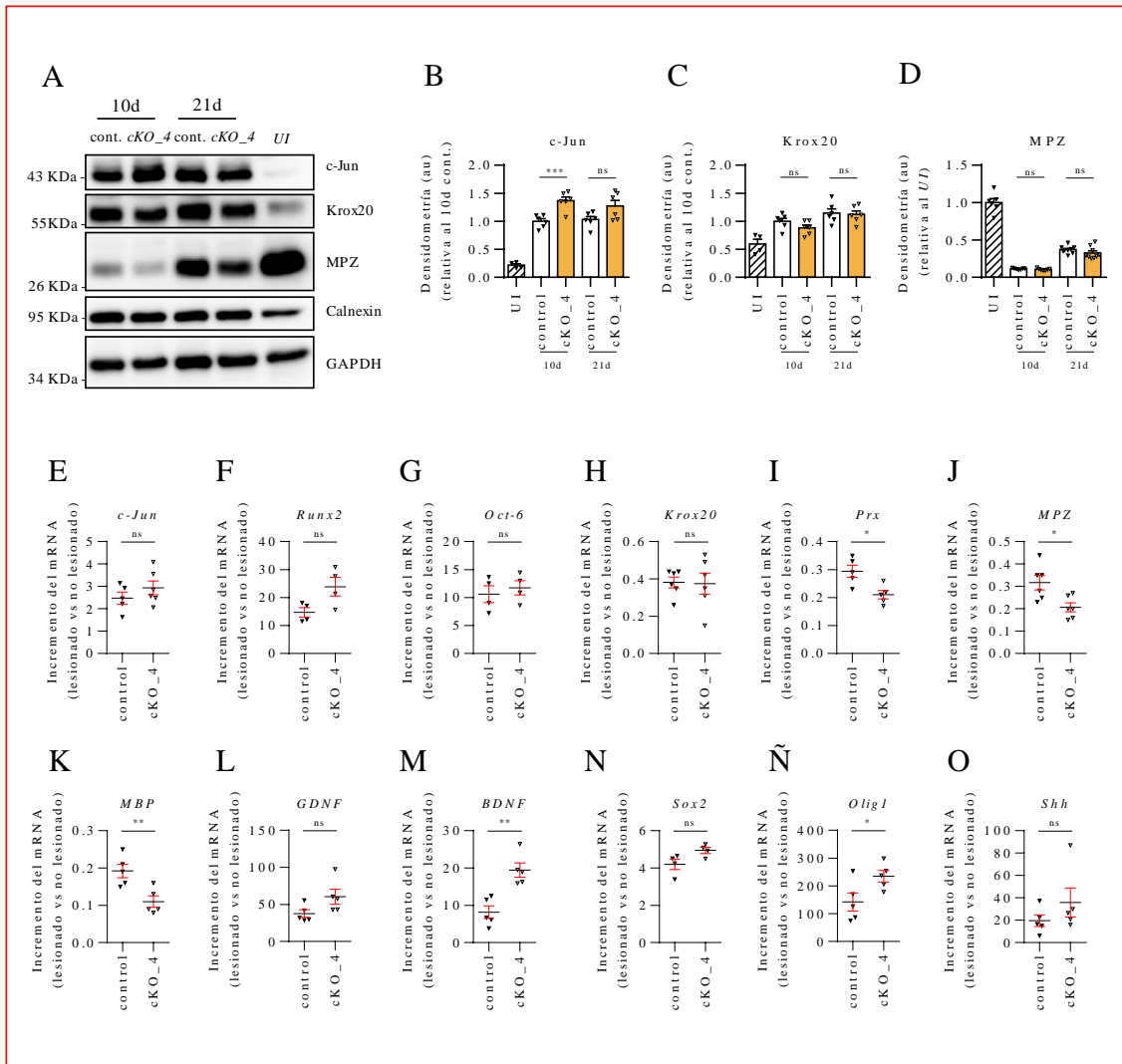
*box plot* del *g-ratio* de los nervios ciáticos *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*. **(E)** Número de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro no mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*. **(F)** Número de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC no mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*. **(G)** Número total de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*. **(H)** Número total de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC en una relación 1:1 por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*. **(I)** Número de núcleos de SC por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*. **(J)** Número de núcleos de mSC por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*. **(K)** Porcentaje de axones mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*. **(L)** Imágenes de microscopía óptica de los nervios ciáticos de ratones control y *cKO\_4* tomadas 4 días después de la lesión (63x). Las barras miden 5  $\mu\text{m}$ . **(M)** Número de vainas de mielina intactas en los nervios ciáticos de los ratones control y *cKO\_4* tomadas 4 días después de la lesión (control  $n = 6$  y *cKO\_4*  $n = 6$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. Gráfica de barras, con los puntos de cada muestra superpuestos, que muestran la media  $\pm$  el error estándar. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Para confirmar los resultados obtenidos por la TEM, cuantificamos mediante *Western blots* los niveles de proteínas de c-Jun (regulador negativo de la mielinización), Krox20 (regulador positivo de la mielinización) y Mpz (proteína de la mielina) a los 10 y 21 días después de lesionar el nervio ciático de los ratones control y *cKO\_4*. Además, cuantificamos los niveles de Calnexin y Gapdh como controles internos de carga. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *cKO\_4* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a una operación para lesionar el nervio ciático mediante un modelo de *crush*. A diferentes tiempos después de la lesión (10 y 21 días) los ratones fueron sacrificados y sus nervios ciáticos no lesionados (*UI*) y lesionados extraídos y procesados para *Western blot* (Figura 18.A). La cuantificación densitométrica de los *Western blots* de c-Jun normalizada a los 10 días control, mostró que a los 10 días después de la lesión en el nervio ciático del *cKO\_4* había más c-Jun que en el control ( $1 \pm 0,05$  au control vs  $1,36 \pm 0,07$  au *cKO\_4*;  $p < 0,001$ ), mientras que a los 21 días después de la lesión ya no había diferencias entre ambos ( $1,03 \pm 0,05$  au control vs  $1,27 \pm 0,1$  au *cKO\_4*;  $p = 0,056$ ) (Figura 18.B). La cuantificación de los *Western blots* de Krox20 demostró que no había diferencias entre los ratones *cKO\_4* y sus hermanos controles a los 10 días después de la lesión ( $1 \pm 0,05$  au control vs  $0,88 \pm 0,05$  au *cKO\_4*;  $p = 0,146$ ), ni a los 21 días después de la lesión ( $1,15 \pm 0,08$  au control vs  $1,12 \pm 0,06$  au *cKO\_4*;  $p = 0,816$ ) (Figura 18.C). Por último, la cuantificación de Mpz mostró que tampoco había diferencias entre los ratones control y *cKO\_4* a los 10 días después de la lesión ( $0,27 \pm 0,03$  au control vs  $0,17 \pm 0,02$  au *cKO\_4*;  $p = 0,284$ ), ni a los 21 días después de la lesión ( $0,57 \pm 0,06$  au control vs  $0,57 \pm 0,06$  au *cKO\_4*;  $p = 0,170$ ) (Figura 18.D).

También cuantificamos mediante qPCR los niveles de expresión de reguladores negativos (*c-Jun*, *Runx2*, *Gdnf*, *Bdnf*, *Sox2*, *Olig1* y *Shh*) y positivos (*Oct-6*, *Krox20*, *Prx*, *Mpz* y *Mbp*) de la mielinización. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *cKO\_4* con 8 semanas de vida. Diez días tras lesionar el nervio ciático (modelo de *crush*) los ratones fueron sacrificados y sus nervios ciáticos no lesionados (*UI*) y lesionados extraídos. De los nervios *UI* recogimos 3 cm, mientras que de los nervios lesionados recogimos los primeros 8 mm de la zona distal de la lesión, luego fueron procesados para qPCR. Los niveles de los mRNAs en los nervios lesionados de los ratones *cKO\_4* y control fueron normalizados a los valores de los nervios *UI* de los mismos ratones. No detectamos diferencias en los niveles de los

mRNAs entre ratones *cKO\_4* y sus controles para *c-Jun* ( $2,48 \pm 0,27$  fc control vs  $2,94 \pm 0,31$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,300$ ) (Figura 18.E), *Runx2* ( $14,73 \pm 1,68$  fc control vs  $23,89 \pm 3,37$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,051$ ) (Figura 18.F), *Oct-6* ( $10,63 \pm 1,5$  fc control vs  $11,75 \pm 1,27$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,590$ ) (Figura 18.G), *Krox20* ( $0,38 \pm 0,03$  fc control vs  $0,38 \pm 0,06$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,918$ ) (Figura 18.H), *Gdnf* ( $37,65 \pm 5,1$  fc control vs  $60,37 \pm 9,99$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,078$ ) (Figura 18.L), *Sox2* ( $4,2 \pm 0,28$  fc control vs  $4,95 \pm 0,17$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,062$ ) (Figura 18.N) ni *Shh* ( $19,55 \pm 5,16$  fc control vs  $35,98 \pm 12,94$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,272$ ) (Figura 18.O). Sin embargo si que detectamos menores niveles de los mRNAs de *Prx* ( $0,29 \pm 0,02$  fc control vs  $0,21 \pm 0,02$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,013$ ) (Figura 18.I), *Mpz* ( $0,32 \pm 0,03$  fc control vs  $0,21 \pm 0,02$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,016$ ) (Figura 18.J) y *Mbp* ( $0,19 \pm 0,02$  fc control vs  $0,11 \pm 0,02$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,008$ ) (Figura 18.K) en los ratones *cKO\_4*. Por último, detectamos mayores niveles de los mRNAs de *Bdnf* ( $8,16 \pm 1,67$  fc control vs  $19,43 \pm 1,89$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,002$ ) (Figura 18.M) y *Olig1* ( $142,31 \pm 32,35$  fc control vs  $234,9 \pm 20,66$  fc *cKO\_4*;  $p = 0,042$ ) (Figura 18.Ñ) en los ratones *cKO\_4* comparados con sus controles.

En resumen, los datos obtenidos mediante *Western blot* y qPCRs mostraban que si bien existen algunos pequeños cambios en los marcadores de mielinización de los ratones *cKO\_4*, estos no son muy grandes y el proceso de regeneración y re-mielinización tras la lesión procede de manera similar al de los ratones control.



**Figura 18.** La eliminación *in vivo* de la *HDAC4* en las células de Schwann no afecta al proceso de regeneración y re-mielinización después de la lesión del nervio ciático. **(A)** Western blot de los niveles de c-Jun, Krox-20, MPZ, Calnexin y Gapdh en los nervios ciáticos *UI*, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones control (*P0-Cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>*) y *cKO\_4* (*P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>*). **(B-D)** Análisis densitométrico de los Westerns blot, *UI* (control *n* = 2 y *cKO\_4* *n* = 2), 10 días (control *n* = 6 y *cKO\_4* *n* = 6) y 21 días (control *n* = 6 y *cKO\_4* *n* = 6). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando ratones control y *cKO\_4* a 10 y 21 días después de la lesión por separado. Gáfica de barras, con los puntos de cada muestra superpuestos, que muestran la media ± el error estándar. **(B)** Niveles de c-Jun (au) en los nervios ciáticos *UI*, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*, normalizados a los 10 días después de la lesión del control. **(C)** Niveles de Krox20 (au) en los nervios ciáticos *UI*, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*, normalizados a los 10 días después de la lesión del control. **(D)** Niveles de *Mpz* (au) en los nervios ciáticos *UI*, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_4*, normalizados a los *UI*. **(E-O)** Niveles de mRNA mediante qPCR de reguladores negativos y positivos de la mielinización de los nervios ciáticos de ratones control y *cKO\_4* a 10 días después de la lesión. Gráficas de puntos que muestran la media ± el error estándar de los niveles de mRNA en el nervio lesionado normalizado a los niveles del nervio *UI* del mismo ratón. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. **(E)** *c-Jun* (control *n* = 5 y *cKO\_4* *n* = 6). **(F)** *Runx2* (control *n* = 4 y *cKO\_4* *n* = 4). **(G)** *Oct-6* (control *n* = 4 y *cKO\_4* *n* = 4). **(H)** *Krox20* (control *n* = 6 y *cKO\_4* *n* = 6). **(I)** *Prx* (control *n* = 5 y *cKO\_4* *n* = 5). **(J)** *MPZ* (control *n* = 6 y *cKO\_4* *n* = 6). **(K)** *MBP* (control *n* = 5 y *cKO\_4* *n* = 5). **(L)** *GDNF* (control *n* = 5 y *cKO\_4* *n* = 5). **(M)** *BDNF* (control *n* = 5 y *cKO\_4* *n* = 5). **(N)** *Sox2* (control *n* = 4 y *cKO\_4* *n* = 4). **(Ñ)** *Olig1* (control *n* = 5 y *cKO\_4* *n* = 5). **(O)** *Shh* (control *n* = 5 y *cKO\_4* *n* = 5). \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001.



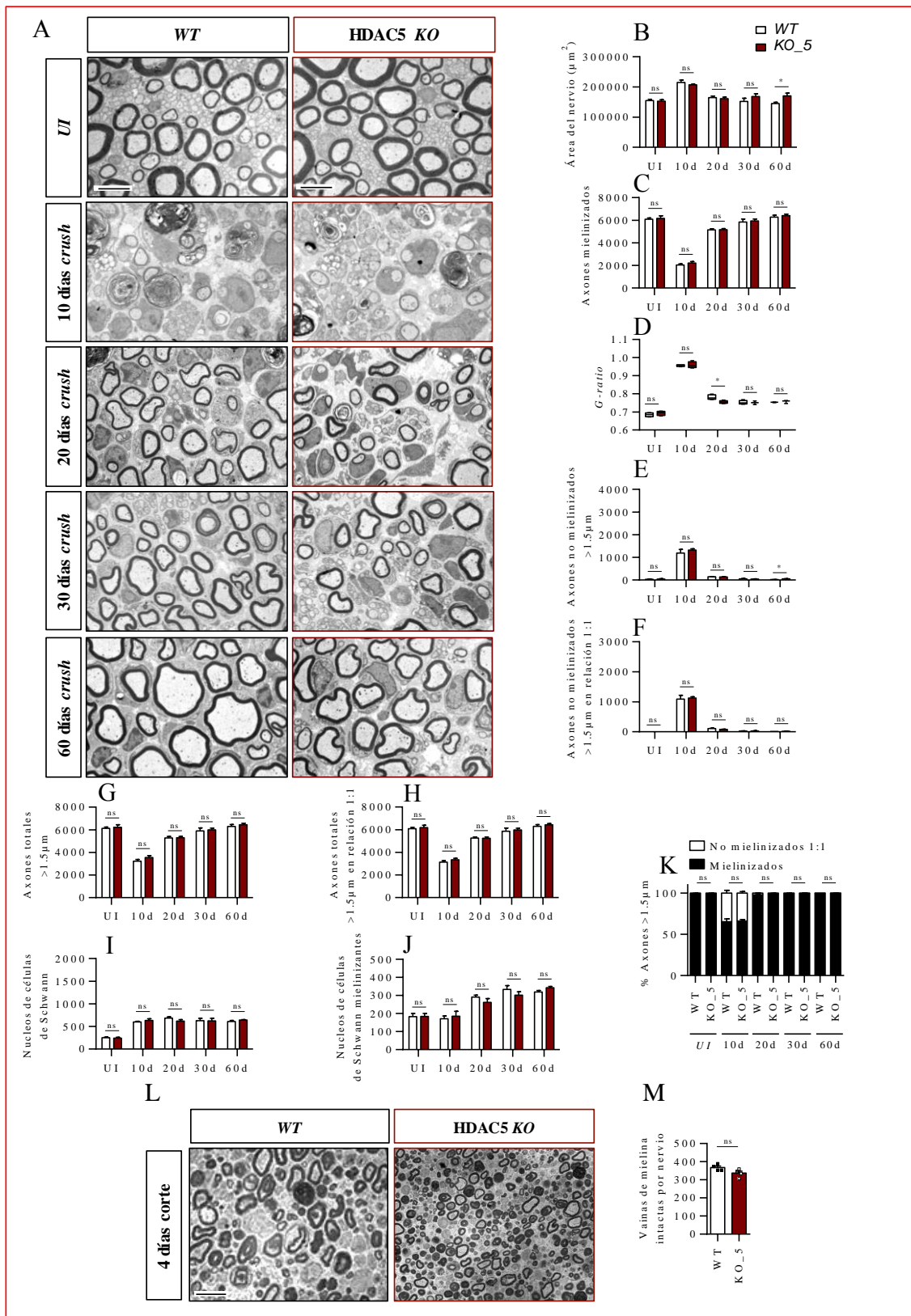
### 15. Efectos de la eliminación de la *HDAC5* en la re-mielinización del SNP después de la lesión.

Nuestro siguiente paso fue estudiar los efectos de la eliminación *in vivo* de la *HDAC5* en las SC sobre la regeneración y la re-mielinización del SNP después de la lesión. Como he indicado previamente, durante el desarrollo postembrionario no detectamos diferencias obvias en la mielinización entre los ratones *WT* y *KO\_5* (*HDAC5*<sup>-/-</sup>) hermanos de camada (ver [Figura 13](#)). A continuación, comprobamos que tampoco existían diferencias en el número de axones y el grado de mielinización en los ratones adultos de 9 semanas y media (P66) (ver los *UI* de *WT* y *KO\_5* en la [Figura 19](#)), lo que nos permitió estudiar *in vivo* la cinética de la regeneración y la re-mielinización axonal.

Primero estudiamos si la eliminación *in vivo* de la *HDAC5* causaba alteraciones en la activación de la degeneración Walleriana. Para ello, empleamos ratones de la colonia *KO\_5* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a un modelo de lesión por corte (como en el caso de los ratones *cKO\_4*). Como podemos ver ([Figuras 19.L](#) y [19.M](#)) la eliminación *in vivo* de la *HDAC5* no afecta a la degeneración Walleriana ( $368 \pm 9$  vainas de mielina intactas en el *WT* vs  $337 \pm 11$  en el *KO\_5*;  $p = 0,072$ ). Después, procedimos a estudiar el proceso de re-mielinización. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *KO\_5* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a un modelo de lesión *crush*. A diferentes tiempos después de la lesión (10, 20, 30 y 60 días) los ratones fueron sacrificados y sus nervios ciáticos no lesionados (*UI*) y lesionados fueron procesados para microscopía electrónica de transmisión ([Figura 19.A](#)). No se apreciaron diferencias en las áreas de los nervios ciáticos *UI* ( $155.107 \pm 4.058 \mu\text{m}^2$  *WT* vs  $152.954 \pm 5.121 \mu\text{m}^2$  *KO\_5*;  $p = 0,753$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $215.140 \pm 7.409 \mu\text{m}^2$  *WT* vs  $207.334 \pm 2.157 \mu\text{m}^2$  *KO\_5*;  $p = 0,351$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $164.863 \pm 5.154 \mu\text{m}^2$  *WT* vs  $160.974 \pm 5.002 \mu\text{m}^2$  *KO\_5*;  $p = 0,607$ ), ni tampoco a los 30 días después de la lesión ( $152.210 \pm 10.235 \mu\text{m}^2$  *WT* vs  $168.494 \pm 9.386 \mu\text{m}^2$  *KO\_5*;  $p = 0,327$ ), mientras que a los 60 días después de la lesión las áreas de los *KO\_5* fueron un poco más grandes que las del *WT* ( $144.730 \pm 4.484 \mu\text{m}^2$  *WT* vs  $170.206 \pm 9.238 \mu\text{m}^2$  *KO\_5*;  $p = 0,042$ ) ([Figura 19.B](#)). No hubo diferencias en el número de axones mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $6.088 \pm 120$  en el *WT* vs  $6.170 \pm 222$  en el *KO\_5*;  $p = 0,754$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $2.038 \pm 97$  en el *WT* vs  $2.214 \pm 137$  en el *KO\_5*;  $p = 0,333$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $5.144 \pm 102$  en el *WT* vs  $5.158 \pm 106$  en el *KO\_5*;  $p = 0,926$ ), ni a los 30 días después de la lesión ( $5.850 \pm 266$  en el *WT* vs  $5.946 \pm 165$  en el *KO\_5*;  $p = 0,808$ ), y tampoco a los 60 días después de la lesión ( $6.277 \pm 162$  en el *WT* vs  $6.402 \pm 132$  en el *KO\_5*;  $p = 0,595$ ) ([Figura 19.C](#)). Tampoco detectamos diferencias en el *g-ratio* de los axones mielinizados de los nervios ciáticos *UI* ( $0,68 \pm 0,01$  en el *WT* vs  $0,69 \pm 0,01$  en el *KO\_5*;  $p = 0,327$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $0,96 \pm 0,01$  en el *WT* vs  $0,96 \pm 0,01$  en el *KO\_5*;  $p = 0,705$ ). Sin embargo, a los 20 días después de la lesión el *g-ratio* del *KO\_5* es algo menor que el del hermano de camada *WT* ( $0,78 \pm 0,01$  en el *WT* vs  $0,75 \pm 0,01$  en el *KO\_5*;  $p = 0,015$ ). Estas diferencias desaparecen a los 30 días después de la lesión ( $0,75 \pm 0,01$  en el *WT* vs  $0,75 \pm 0,01$  en el *KO\_5*;  $p = 0,799$ ), estabilizándose a los 60 días después de la lesión ( $0,75 \pm 0,01$  en el *WT* vs  $0,76 \pm 0,01$  en el *KO\_5*;  $p = 0,541$ ) ([Figura 19.D](#)). No detectamos diferencias en el número de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro

sorteados por las SC no mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $35 \pm 9$  en el *WT* vs  $47 \pm 15$  en el *KO\_5*;  $p = 0,523$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $1.194 \pm 155$  en el *WT* vs  $1.326 \pm 51$  en el *KO\_5*;  $p = 0,450$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $144 \pm 15$  en el *WT* vs  $133 \pm 14$  en el *KO\_5*;  $p = 0,627$ ), ni a los 30 días después de la lesión ( $51 \pm 16$  en el *WT* vs  $47 \pm 10$  en el *KO\_5*;  $p = 0,708$ ), mientras que a los 60 días después de la lesión el número de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC no mielinizados en los nervios ciáticos del *KO\_5* fue mayor que en el *WT* ( $22 \pm 6$  en el *WT* vs  $52 \pm 9$  en el *KO\_5*;  $p = 0,035$ ) (Figura 19.E). Por otra parte, no detectamos diferencias en el número de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $4 \pm 2$  en el *WT* vs  $5 \pm 2$  en el *KO\_5*;  $p = 0,924$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $1.088 \pm 131$  en el *WT* vs  $1.123 \pm 42$  en el *KO\_5*;  $p = 0,804$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $109 \pm 14$  en el *WT* vs  $82 \pm 7$  en el *KO\_5*;  $p = 0,137$ ), ni a los 30 días después de la lesión ( $22 \pm 7$  en el *WT* vs  $27 \pm 12$  en el *KO\_5*;  $p = 0,703$ ), y tampoco a los 60 días después de la lesión ( $11 \pm 3$  en el *WT* vs  $20 \pm 7$  en el *KO\_5*;  $p = 0,275$ ) (Figura 19.F). No detectamos diferencias en el número total de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC en los nervios ciáticos *UI* ( $6.123 \pm 113$  en el *WT* vs  $6.217 \pm 224$  en el *KO\_5*;  $p = 0,719$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $3.232 \pm 147$  en el *WT* vs  $3.540 \pm 171$  en el *KO\_5*;  $p = 0,221$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $5.288 \pm 115$  en el *WT* vs  $5.292 \pm 115$  en el *KO\_5*;  $p = 0,980$ ), ni a los 30 días después de la lesión ( $5.901 \pm 268$  en el *WT* vs  $5.987 \pm 155$  en el *KO\_5*;  $p = 0,825$ ), ni tampoco a los 60 días después de la lesión ( $6.298 \pm 167$  en el *WT* vs  $6.454 \pm 132$  en el *KO\_5*;  $p = 0,521$ ) (Figura 19.G). Tampoco detectamos diferencias en el número total de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) en los nervios ciáticos *UI* ( $6.092 \pm 119$  en el *WT* vs  $6.175 \pm 224$  en el *KO\_5*;  $p = 0,755$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $3.125 \pm 132$  en el *WT* vs  $3.337 \pm 128$  en el *KO\_5*;  $p = 0,293$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $5.253 \pm 108$  en el *WT* vs  $5.240 \pm 110$  en el *KO\_5*;  $p = 0,939$ ), ni a los 30 días después de la lesión ( $5.872 \pm 269$  en el *WT* vs  $5.973 \pm 155$  en el *KO\_5*;  $p = 0,798$ ), ni tampoco a los 60 días después de la lesión ( $6.288 \pm 164$  en el *WT* vs  $6.422 \pm 126$  en el *KO\_5*;  $p = 0,572$ ) (Figura 19.H). No detectamos diferencias en el número de núcleos de SC en los nervios ciáticos *UI* ( $254 \pm 10$  en el *WT* vs  $244 \pm 19$  en el *KO\_5*;  $p = 0,659$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $598 \pm 18$  en el *WT* vs  $632 \pm 38$  en el *KO\_5*;  $p = 0,453$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $683 \pm 28$  en el *WT* vs  $618 \pm 36$  en el *KO\_5*;  $p = 0,207$ ), ni a los 30 días después de la lesión ( $630 \pm 51$  en el *WT* vs  $626 \pm 55$  en el *KO\_5*;  $p = 0,954$ ), ni tampoco a los 60 días después de la lesión ( $611 \pm 25$  en el *WT* vs  $644 \pm 5$  en el *KO\_5*;  $p = 0,301$ ) (Figura 19.I). Tampoco detectamos diferencias en el número de núcleos de SC mielinizantes en los nervios ciáticos *UI* ( $183 \pm 17$  en el *WT* vs  $185 \pm 16$  en el *KO\_5*;  $p = 0,950$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $172 \pm 14$  en el *WT* vs  $186 \pm 27$  en el *KO\_5*;  $p = 0,669$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $291 \pm 11$  en el *WT* vs  $262 \pm 21$  en el *KO\_5*;  $p = 0,262$ ), ni a los 30 días después de la lesión ( $333 \pm 22$  en el *WT* vs  $302 \pm 19$  en el *KO\_5*;  $p = 0,374$ ), ni tampoco a los 60 días después de la lesión ( $320 \pm 8$  en el *WT* vs  $343 \pm 7$  en el *KO\_5*;  $p = 0,106$ ) (Figura 19.J). Por último, no detectamos diferencias con respecto al porcentaje de axones mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $99,93 \pm 0,03$  % *WT* vs  $99,93 \pm 0,03$  % *KO\_5*;  $p = 0,074$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $65,43 \pm 3,33$  % *WT* vs  $66,2 \pm 1,76$  %

*KO\_5*;  $p = 0,845$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $97,94 \pm 0,25$  % *WT* vs  $98,44 \pm 0,11$  % *KO\_5*;  $p = 0,118$ ), ni a los 30 días después de la lesión ( $99,63 \pm 0,11$  % *WT* vs  $99,54 \pm 0,22$  % *KO\_5*;  $p = 0,717$ ), ni tampoco a los 60 días después de la lesión ( $99,82 \pm 0,08$  % *WT* vs  $99,69 \pm 0,12$  % *KO\_5*;  $p = 0,260$ ) (Figura 19.K). Nuestros datos sugerían pues que la eliminación *in vivo* de la *HDAC5* en las células de Schwann no afecta al proceso de regeneración y re-mielinización después de la lesión del nervio ciático.



**Figura 19.** La eliminación *in vivo* de la *HDAC5* en las células de Schwann no afecta al proceso de regeneración y re-mielinización después de la lesión del nervio ciático. **(A)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los nervios ciáticos de ratones *WT* y *KO\_5* (*HDAC5*<sup>-/-</sup>) UI y 10\_20\_30 días después de la lesión tomadas a 3.000x. Las barras miden 5 µm. **(B\_K)** Análisis morfológico de las imágenes de microscopía electrónica de los nervios ciáticos UI (*WT* n = 4 y *KO\_5* n = 4), 10 días (*WT* n = 4 y *KO\_5* n = 4), 20 días (*WT* n = 4 y *KO\_5* n = 4), 30 días (*WT* n = 5 y *KO\_5* n = 3) y 60 días después de

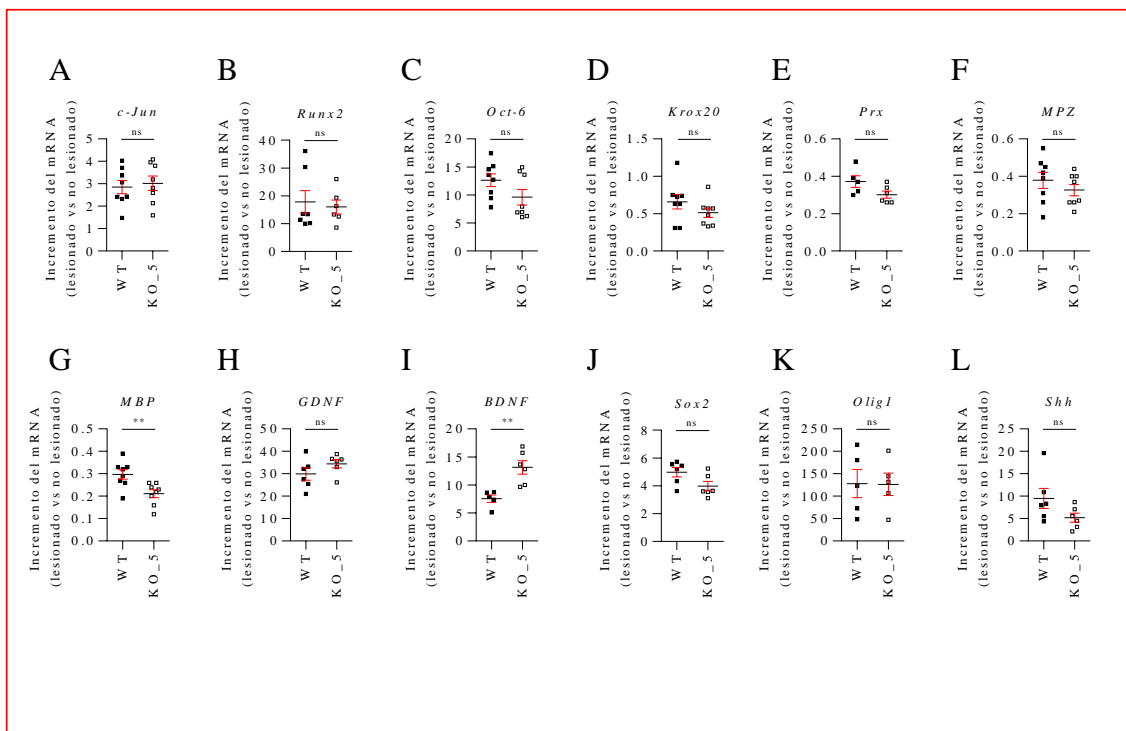
la lesión (*WT* n = 4 y *KO\_5* n = 3). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando los nervios ciáticos de los ratones *WT* y *KO\_5* *UI*, 10 días, 20 días, 30 días y 60 días después de la lesión por separado. Gáfica de barras que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(B)** Áreas totales de los nervios ciáticos *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones *WT* y *KO\_5*. **(C)** Número de axones mielinizados por nervio ciático *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones *WT* y *KO\_5*. **(D)** *Tukey's box plot* del *g-ratio* de la mielina de los axones mielinizados de los nervios ciáticos *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones *WT* y *KO\_5*. **(E)** Número de axones > 1,5  $\mu$ m de diámetro no mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones *WT* y *KO\_5*. **(F)** Número de axones > 1,5  $\mu$ m de diámetro sorteados por las SC no mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones *WT* y *KO\_5*. **(G)** Número total de axones > 1,5  $\mu$ m de diámetro por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones *WT* y *KO\_5*. **(H)** Número total de axones > 1,5  $\mu$ m de diámetro sorteados por las SC en una relación 1:1 por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones *WT* y *KO\_5*. **(I)** Número de núcleos de SC por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones *WT* y *KO\_5*. **(J)** Número de núcleos de mSC por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones *WT* y *KO\_5*. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar. **(K)** Porcentaje de axones mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones *WT* y *KO\_5*. **(L)** Imágenes de microscopía óptica de los nervios ciáticos de ratones *WT* y *KO\_5* a los 4 días después de la lesión tomadas a 63x. Las barras miden 5  $\mu$ m. **(M)** Número de vainas de mielina intactas en los nervios ciáticos de los ratones *WT* y *KO\_5* a los 4 días después de la lesión (*WT* n = 4 y *KO\_5* n = 4). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el t de Student a dos colas. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

Para confirmar los resultados obtenidos por la TEM, cuantificamos (mediante *Western blot*) los niveles de proteína de c-Jun (regulador negativo de la mielinización), Krox20 (regulador positivo de la mielinización) y Mpz (proteína de la mielina), a los 10 días después de lesionar el nervio ciático de los ratones *WT* y *KO\_5*. Además, cuantificamos los niveles de Calnexin y Gapdh como controles internos de carga. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *KO\_5* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a una operación para lesionar el nervio ciático mediante un modelo de *crush*, 10 días después de la lesión los ratones fueron sacrificados y sus nervios procesados para *Western blot* (ver estudios sobre el *cKO\_4*). No se apreciaron diferencias obvias en las cantidades de c-Jun, Krox20 y MPZ entre el ratón *WT* y el *KO\_5* a los 10 días después de la lesión (Figura 25.A). La cuantificación densitométrica de los *Western blot* de c-Jun nos confirmó que no había diferencias en los niveles de la proteína c-Jun entre el *KO\_5* y el *WT* ( $1 \pm 0,06$  au *WT* vs  $1,17 \pm 0,09$  au *KO\_5*; p = 0,146) (Figura 25.B) ni en los niveles de Krox20 entre el *KO\_5* y el *WT* ( $1 \pm 0,04$  au *WT* vs  $0,95 \pm 0$  au *KO\_5*; p = 0,528) (Figura 25.C). Tampoco encontramos diferencias en los niveles de Mpz entre los ratones *KO\_5* y *WT* ( $0,13 \pm 0,01$  au *WT* vs  $0,13 \pm 0,01$  au *KO\_5*; p = 0,576) (Figura 25.D).

También cuantificamos mediante qPCR los niveles de expresión de reguladores negativos (*c-Jun*, *Runx2*, *Gdnf*, *Bdnf*, *Sox2*, *Olig1* y *Shh*) y positivos (*Oct-6*, *Krox20*, *Prx*, *Mpz* y *Mbp*) de la mielinización. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *KO\_5* con 8 semanas de vida, y procedimos tal como se describe más arriba (ver estudios en el *cKO\_4*). No detectamos diferencias en los niveles de los mRNA entre los ratones *KO\_5* comparados con los *WT* hermanos de camada para *c-Jun* ( $2,85 \pm 0,3$  fc *WT* vs  $3,02 \pm 0,32$  fc *KO\_5*; p = 0,703) (Figura 20.A), *Runx2* ( $17,86 \pm 4,05$  fc *WT* vs  $16,04 \pm 2,49$  fc *KO\_5*; p = 0,720) (Figura 20.B), *Oct-6* ( $12,64 \pm 1,14$  fc *WT* vs  $9,61 \pm 1,38$  fc *KO\_5*; p = 0,112) (Figura 20.C), *Krox20* ( $0,66 \pm 0,1$  fc *WT* vs  $0,51 \pm 0,06$  fc *KO\_5*; p = 0,224) (Figura 20.D), *Prx* ( $0,37 \pm 0,03$  fc *WT* vs  $0,3 \pm 0,02$  fc *KO\_5*; p = 0,077) (Figura 20.E), *Mpz* ( $0,38 \pm 0,04$  fc *WT* vs  $0,33 \pm 0,03$  fc *KO\_5*; p = 0,334) (Figura 20.F), *Gdnf* ( $29,9 \pm 2,73$  fc *WT* vs  $34,44 \pm 1,82$  fc *KO\_5*; p = 0,196) (Figura

20.H), *Sox2* ( $4,98 \pm 0,34$  fc *WT* vs  $3,98 \pm 0,33$  fc *KO\_5*;  $p = 0,061$ ) (Figura 20.J), *Olig1* ( $128,09 \pm 31,4$  fc *WT* vs  $126,45 \pm 25,13$  fc *KO\_5*;  $p = 0,969$ ) (Figura 20.K) y *Shh* ( $9,48 \pm 2,24$  fc *WT* vs  $5,18 \pm 1$  fc *KO\_5*;  $p = 0,110$ ) (Figura 20.L). Mientras que sí detectamos reducciones ligeras en los mRNAs de *Mbp* en los ratones *KO\_5* ( $0,3 \pm 0,02$  fc *WT* vs  $0,21 \pm 0,02$  fc *KO\_5*;  $p = 0,007$ ) (Figura 20.G). Por último, detectamos mayores niveles de los mRNAs de *Bdnf* en los ratones *KO\_5* ( $7,54 \pm 0,66$  fc *WT* vs  $13,14 \pm 1,2$  fc *KO\_5*;  $p = 0,004$ ) (Figura 20.I).

Los resultados de los *Western blot* y qPCR confirmaban los datos que obtuvimos previamente mediante TEM, mostrando que la eliminación *in vivo* de la *HDAC5* no altera significativamente el programa de regeneración y el de re-mielinización de los nervios periféricos.



**Figura 20.** La eliminación *in vivo* de la *HDAC5* en las células de Schwann no afecta al proceso de regeneración y re-mielinización después de la lesión del nervio ciático. (A\_L) Niveles de mRNA mediante qPCR de reguladores negativos y positivos de la mielinización de los nervios ciáticos de ratones *WT* y *KO\_5* a 10 días después de la lesión. Gráficas de puntos que muestran la media  $\pm$  el error estándar de los niveles de mRNA en el nervio lesionado normalizado a los niveles del nervio *UI* del mismo ratón. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. (A) *c-Jun* (*WT* n = 8 y *KO\_5* n = 8). (B) *Runx2* (*WT* n = 7 y *KO\_5* n = 6). (C) *Oct-6* (*WT* n = 8 y *KO\_5* n = 8). (D) *Krox20* (*WT* n = 8 y *KO\_5* n = 8). (E) *Prx* (*WT* n = 5 y *KO\_5* n = 6). (F) *Mpz* (*WT* n = 8 y *KO\_5* n = 8). (G) *Mbp* (*WT* n = 8 y *KO\_5* n = 8). (H) *Gdnf* (*WT* n = 8 y *KO\_5* n = 6). (I) *Bdnf* (*WT* n = 5 y *KO\_5* n = 6). (J) *Sox2* (*WT* n = 6 y *KO\_5* n = 6). (K) *Olig1* (*WT* n = 5 y *KO\_5* n = 5). (L) *Shh* (*WT* n = 6 y *KO\_5* n = 6). \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

## 16. Efectos de la eliminación de la *HDAC7* en la re-mielinización del SNP después de la lesión.

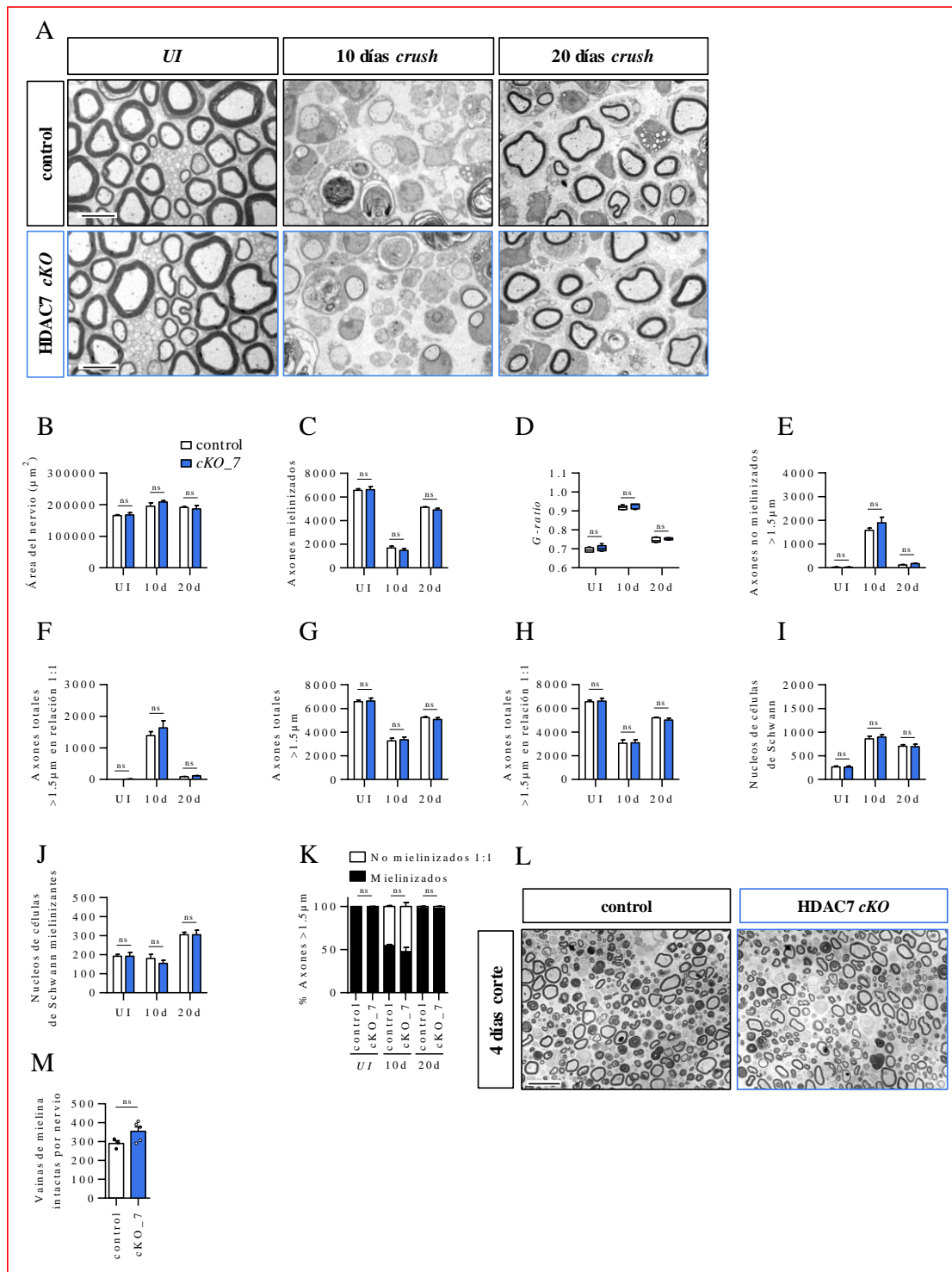
Nuestro siguiente paso fue estudiar los efectos de la eliminación *in vivo* de la *HDAC7* de las células de Schwann sobre la regeneración y la re-mielinización del SNP después de la lesión. Como ya he indicado antes, durante el desarrollo postembrionario no detectamos diferencias en la mielinización entre los ratones control

( $P0-Cre^{-/-}; HDAC7^{flx/flx}$ ) y  $cKO\_7$  ( $P0-Cre^{+/-}; HDAC7^{flx/flx}$ ) (ver [Figura 14](#)). Posteriormente comprobamos que en los ratones adultos de 9 semanas y media (P66) tampoco había diferencias en el número de axones y el grado de mielinización de estos (ver los *UI* de control y  $cKO\_7$  en la [Figura 21](#)), lo que nos permitió *in vivo* estudiar la cinética de la regeneración y la re-mielinización axonal a diferentes tiempos después de lesionar los nervios ciáticos.

Primero estudiamos si la eliminación *in vivo* de la *HDAC7* causaba alteraciones en la activación de la degeneración Walleriana. Para ello, empleamos ratones de la colonia  $cKO\_7$  con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a un modelo de lesión por corte (ver estudios en el  $cKO\_4$ ). La eliminación *in vivo* de la *HDAC7* no afecta a la activación de la degeneración Walleriana ([Figura 21.L](#)) ( $290 \pm 15$  vainas de mielina intactas en el control vs  $355 \pm 23$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,098$ ) ([Figura 21.M](#)). Después procedimos a estudiar el proceso de re-mielinización. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia  $cKO\_7$  con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a una lesión del nervio ciático (modelo de *crush*). A los 10 y 20 días tras la lesión fueron sacrificados y sus nervios ciáticos estudiados mediante TEM. No se apreciaron diferencias obvias entre el ratón  $cKO\_7$  y el control (hermano de camada  $P0Cre^{-/-}$ ) ([Figura 21.A](#)). La morfometría mostró que no hay diferencias en las áreas de los nervios ciáticos *UI* ( $165.776 \pm 2.923 \mu m^2$  control vs  $167.925 \pm 6.910 \mu m^2$   $cKO\_7$ ;  $p = 0,782$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $195.235 \pm 10.494 \mu m^2$  control vs  $208.393 \pm 4.375 \mu m^2$   $cKO\_7$ ;  $p = 0,281$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $191.607 \pm 2.343 \mu m^2$  control vs  $186.948 \pm 10.556 \mu m^2$   $cKO\_7$ ;  $p = 0,678$ ) ([Figura 21.B](#)). No hubo diferencias en el número de axones mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $6.555 \pm 134$  en el control vs  $6.611 \pm 244$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,848$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $1.680 \pm 155$  en el control vs  $1.469 \pm 154$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,363$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $5.125 \pm 39$  en el control vs  $4.902 \pm 139$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,161$ ) ([Figura 21.C](#)). Tampoco detectamos diferencias en el *g-ratio* de los axones mielinizados de los nervios ciáticos *UI* ( $0,7 \pm 0,01$  en el control vs  $0,7 \pm 0,01$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,361$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $0,92 \pm 0,01$  en el control vs  $0,93 \pm 0,01$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,300$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $0,75 \pm 0,01$  en el control vs  $0,75 \pm 0,01$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,536$ ) ([Figura 21.D](#)). No detectamos diferencias en el número de axones de más de  $1,5 \mu m$  de diámetro sorteados por las SC no mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $26 \pm 9$  en el control vs  $24 \pm 6$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,878$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $1.578 \pm 91$  en el control vs  $1.901 \pm 234$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,235$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $120 \pm 17$  en el control vs  $175 \pm 17$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,056$ ) ([Figura 21.E](#)). Tampoco detectamos diferencias significativas en el número de axones de más de  $1,5 \mu m$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $0 \pm 0$  en el control vs  $10 \pm 7$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,203$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $1.385 \pm 131$  en el control vs  $1.637 \pm 224$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,359$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $86 \pm 10$  en el control vs  $114 \pm 11$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,100$ ) ([Figura 21.F](#)). No detectamos diferencias en el número total de axones de más de  $1,5 \mu m$  de diámetro sorteados por las SC en los nervios ciáticos *UI* ( $6.581 \pm 136$  en el control vs  $6.635 \pm 245$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,851$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $3.258 \pm 241$  en el control vs  $3.369 \pm 225$  en el  $cKO\_7$ ;  $p = 0,745$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $5.246 \pm 45$  en

el control vs  $5.076 \pm 152$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,316$ ) (Figura 21.G). Tampoco detectamos diferencias en el número total de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) en los nervios ciáticos *UI* ( $6.555 \pm 134$  en el control vs  $6.621 \pm 241$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,819$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $3.065 \pm 276$  en el control vs  $3.106 \pm 233$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,913$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $5.212 \pm 40$  en el control vs  $5.015 \pm 143$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,222$ ) (Figura 21.H). No detectamos diferencias en el número de núcleos de SC en los nervios ciáticos *UI* ( $265 \pm 18$  en el control vs  $259 \pm 24$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,829$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $859 \pm 54$  en el control vs  $898 \pm 46$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,600$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $701 \pm 34$  en el control vs  $694 \pm 51$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,914$ ) (Figura 21.I). Tampoco detectamos diferencias en el número de núcleos pertenecientes a SC mielinizantes en los nervios ciáticos *UI* ( $193 \pm 9$  en el control vs  $193 \pm 20$  en el *cKO\_7*;  $p = 1$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $181 \pm 21$  en el control vs  $155 \pm 17$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,359$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $305 \pm 13$  en el control vs  $305 \pm 23$  en el *cKO\_7*;  $p = 0,989$ ) (Figura 21.J). Por último, no detectamos diferencias con respecto al porcentaje de axones mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $100 \pm 0$  % control vs  $99,84 \pm 0,11$  % *cKO\_7*;  $p = 0,189$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $54,85 \pm 1,11$  % control vs  $47,82 \pm 4,76$  % *cKO\_7*;  $p = 0,189$ ), ni tampoco a los 20 días después de la lesión ( $98,35 \pm 0,19$  % control vs  $97,73 \pm 0,19$  % *cKO\_7*;  $p = 0,056$ ) (Figura 21.K). Estos datos mostraban que la eliminación *in vivo* de la *HDAC7* en las SC no afecta al proceso de regeneración y re-mielinización después de la lesión del nervio ciático.





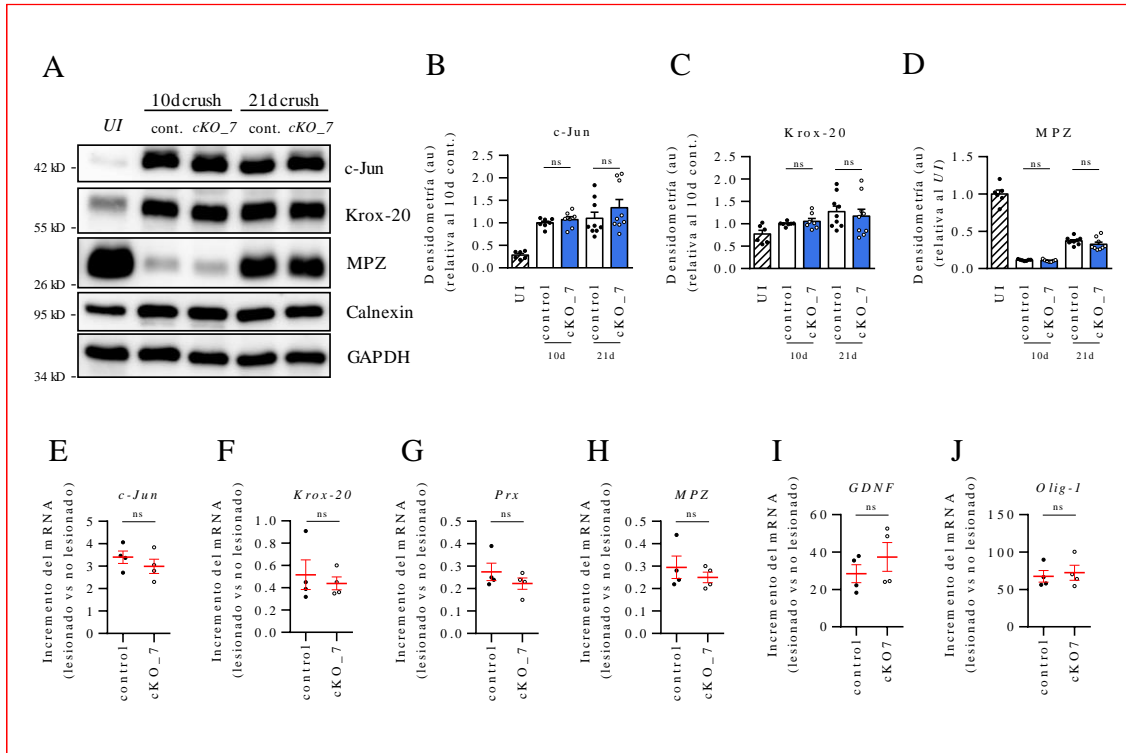
**Figura 21.** La eliminación *in vivo* de la *HDAC7* en las células de Schwann no afecta al proceso de regeneración y re-mielinización después de la lesión del nervio ciático. **(A)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los nervios ciáticos de ratones control ( $P0-Cre^{-/-}; HDAC7^{flx/flx}$ ) y  $cKO_7$  ( $P0-Cre^{+/-}; HDAC7^{flx/flx}$ ) UI y 10\_20 días después de la lesión tomadas a 3.000x. Las barras miden 5  $\mu\text{m}$ . **(B-K)** Análisis morfométrico de las imágenes de microscopía electrónica de los nervios ciáticos UI (control  $n = 5$  y  $cKO_7$   $n = 5$ ), 10 días (control  $n = 5$  y  $cKO_7$   $n = 5$ ) y 20 días (control  $n = 5$  y  $cKO_7$   $n = 5$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando los nervios ciáticos de los ratones control y  $cKO_7$  UI, 10 días y 20 días después de la lesión por separado. Gráfica de barras que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(B)** Áreas totales de los nervios ciáticos UI y 10\_20 días después de la lesión de los ratones control y  $cKO_7$ . **(C)** Número de axones mielinizados por nervio ciático analizado UI y 10\_20 días después de la lesión de los ratones control y  $cKO_7$ . **(D)** *Tukey's box plot* del *g-ratio* de la mielina de los axones mielinizados de los nervios ciáticos UI

y 10\_20 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_7*. **(E)** Número de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro no mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_7*. **(F)** Número de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC no mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_7*. **(G)** Número total de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_7*. **(H)** Número total de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC en una relación 1:1 por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_7*. **(I)** Número de núcleos de SC por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_7*. **(J)** Número de núcleos de mSC por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_7*. **(K)** Porcentaje de axones mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20 días después de la lesión de los ratones control y *cKO\_7*. **(L)** Imágenes de microscopía óptica de los nervios ciáticos de ratones control y *cKO\_7* a los 4 días después de la lesión tomadas a 63x. Las barras miden 5  $\mu\text{m}$ . **(M)** Número de vainas de mielina intactas en los nervios ciáticos de los ratones control y *cKO\_7* a los 4 días después de la lesión (control  $n = 3$  y *cKO\_7*  $n = 5$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. Gráfica de barras, con los puntos de cada muestra superpuestos, que muestran la media  $\pm$  el error estándar. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Para confirmar estos resultados cuantificamos mediante *Western blot* los niveles de proteínas de c-Jun (regulador negativo de la mielinización), Krox20 (regulador positivo de la mielinización) y Mpz (proteína de la mielina) a los 10 y 21 días después de lesionar el nervio ciático de los ratones control y *cKO\_7*. Además, cuantificamos los niveles de Calnexin y Gapdh como controles internos de carga. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *cKO\_7* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a una lesión del nervio ciático (*crush*). Los ratones fueron sacrificados (10 o 21 días después) y sus nervios ciáticos no lesionados (*UI*) y lesionados sometidos a *Western blot*. No se apreciaron diferencias aparentes en los niveles de c-Jun, Krox20 y Mpz entre el ratón control y el *cKO\_7* a los 10 o 21 días después de la lesión (Figura 22.A). En efecto, la cuantificación densitométrica de los *Western blots* de c-Jun confirmó que no había diferencias en los niveles de c-Jun a los 10 días después de la lesión ( $1 \pm 0,04$  au control vs  $1,07 \pm 0,07$  au *cKO\_7*;  $p = 0,367$ ), ni a los 21 días después de la lesión ( $1,11 \pm 0,13$  au control vs  $1,34 \pm 0,18$  au *cKO\_7*;  $p = 0,302$ ) (Figura 22.B). La cuantificación de los *Western blots* de Krox20 mostró que tampoco había diferencias en los niveles de Krox20 a los 10 días después de la lesión ( $1 \pm 0,02$  au control vs  $1,06 \pm 0,07$  au *cKO\_7*;  $p = 0,422$ ), ni a los 21 días después de la lesión ( $1,28 \pm 0,12$  au control vs  $1,17 \pm 0,15$  au *cKO\_7*;  $p = 0,610$ ) (Figura 22.C). Por último, la cuantificación de Mpz mostró que tampoco había diferencias en los niveles de esta proteína a los 10 días ( $0,11 \pm 0,01$  au control vs  $0,11 \pm 0,01$  au *cKO\_7*;  $p = 0,284$ ), ni a los 21 días después de la lesión ( $0,37 \pm 0,02$  au control vs  $0,33 \pm 0,03$  au *cKO\_7*;  $p = 0,170$ ) (Figura 22.D).

También cuantificamos mediante qPCR los niveles de expresión de reguladores negativos (*c-Jun*, *Gdnf* y *Olig1*) y positivos (*Krox20*, *Prx* y *Mpz*) de la mielinización. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *cKO\_7* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a un modelo de *crush* y procesados para qPCR tal como se describe más arriba. No detectamos diferencias en los niveles de los mRNAs de *c-Jun* ( $3,4 \pm 0,28$  fc control vs  $3 \pm 0,32$  fc *cKO\_7*;  $p = 0,377$ ) (Figura 22.E), *Krox20* ( $0,52 \pm 0,13$  fc control vs  $0,44 \pm 0,06$  fc *cKO\_7*;  $p = 0,613$ ) (Figura 22.F), *Prx* ( $0,28 \pm 0,04$  fc control vs  $0,22 \pm 0,03$  fc *cKO\_7*;  $p = 0,302$ ) (Figura 22.G), *Mpz* ( $0,3 \pm 0,05$  fc control vs  $0,25 \pm 0,02$  fc *cKO\_7*;  $p = 0,447$ ) (Figura 22.H), *Olig1* ( $67,64 \pm 7,76$  fc control vs  $72,37 \pm 9,93$  fc *cKO\_7*;  $p = 0,721$ ) (Figura 22.J).

Los datos que obtuvimos mediante *Western blot* y qPCRs confirmaron los datos de TEM, demostrando que la eliminación *in vivo* de la *HDAC7* de las SC no altera la activación del programa de regeneración y el de re-mielinización tras la lesión nerviosa.



**Figura 22. La eliminación *in vivo* de la *HDAC7* en las células de Schwann no afecta al proceso de regeneración y re-mielinización después de la lesión del nervio ciático. (A) *Western blot* de los niveles de c-Jun, Krox-20, MPZ, Calnexin y Gapdh en los nervios ciáticos UI, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones control ( $P0-Cre^{-/-}; HDAC7^{flx/flx}$ ) y  $cKO_7$  ( $P0-Cre^{+/-}; HDAC7^{flx/flx}$ ). (B-D) Densitometría de los *Westerns blots*, UI (control n = 3 y  $cKO_7$  n = 3), 10 días (control n = 7 y  $cKO_7$  n = 7) y 21 días (control n = 9 y  $cKO_7$  n = 9). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando ratones control y  $cKO_7$  a 10 y 21 días después de la lesión por separado. Gáfica de barras, con los puntos de cada muestra superpuestos, que muestran la media  $\pm$  el error estándar. (B) Niveles de c-Jun (au) en los nervios ciáticos UI, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones control y  $cKO_7$ , normalizados a los 10 días después de la lesión del control. (C) Niveles de Krox20 (au) en los nervios ciáticos UI, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones control y  $cKO_7$ , normalizados a los 10 días después de la lesión del control. (D) Niveles de Mpz (au) en los nervios ciáticos UI, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones control y  $cKO_7$ , normalizados a los UI. (E-J) Niveles de mRNA mediante qPCR de reguladores negativos y positivos de la mielinización de los nervios ciáticos de ratones control y  $cKO_7$  a 10 días después de la lesión. Gráficas de puntos que muestran la media  $\pm$  el error estándar de los niveles de mRNA en el nervio lesionado normalizado a los niveles del nervio UI del mismo ratón. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. (E) *c-Jun* (control n = 4 y  $cKO_7$  n = 4). (F) *Krox20* (control n = 4 y  $cKO_7$  n = 4). (G) *Prx* (control n = 4 y  $cKO_7$  n = 4). (H) *Mpz* (control n = 4 y  $cKO_7$  n = 4). (I) *Gdnf* (control n = 4 y  $cKO_7$  n = 4). (J) *Olig1* (control n = 4 y  $cKO_7$  n = 4). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.**

### 17. Efectos de la eliminación simultánea de la HDAC4 y HDAC5 de las células de Schwann en la re-mielinización del SNP después de la lesión.

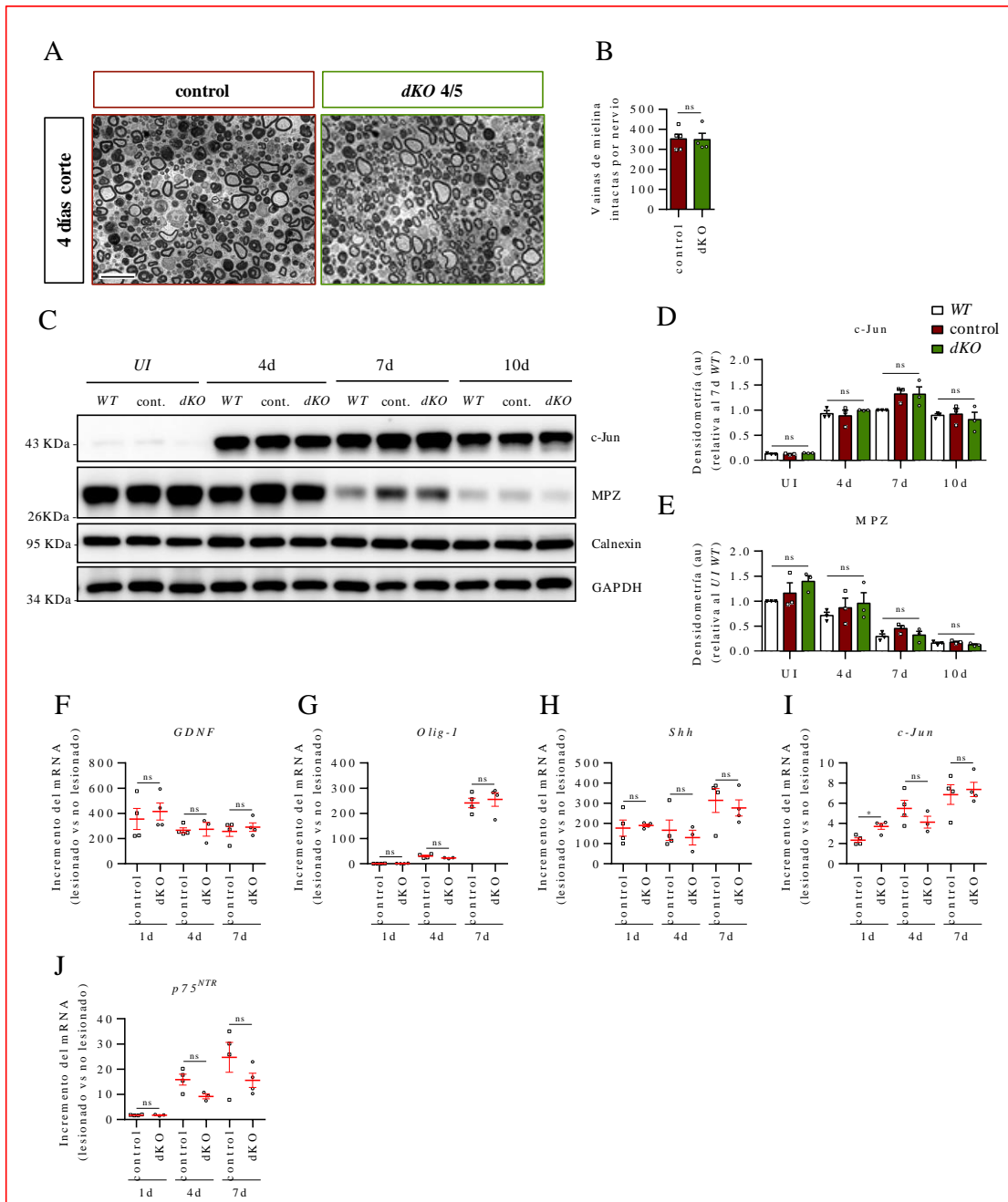
Vistos los resultados anteriores, y puesto que es bien conocida la capacidad de las proteínas de esta familia para la compensación funcional, decidimos estudiar la regeneración y re-mielinización de los ratones *dKO* ( $P0-Cre^{+/-}; HDAC4^{flx/flx}; HDAC5^{-/-}$ ) y sus hermanos de camada control ( $P0-Cre^{-/-}; HDAC4^{flx/flx}; HDAC5^{-/-}$ ). Además, ya

habíamos observado que el *dKO* experimentaba un retraso temporal en el proceso de mielinización durante el desarrollo postnatal (ver [Figura 15](#)) que se revertía a partir de P8. Comprobamos además que en los ratones adultos de 9 semanas y media (P66) no había diferencias en el número de axones y el grado de mielinización (ver los *UI* de control y *dKO* en la [Figura 24](#)), lo que nos permitió *in vivo* estudiar la cinética de la regeneración y la re-mielinización axonal a diferentes tiempos después de lesionar los nervios ciáticos de ratones control y *dKO*.

Primero estudiamos si la eliminación *in vivo* de la *HDAC4* y la *HDAC5* causaba alteraciones en la activación de la degeneración Walleriana. Para ello, empleamos ratones de la colonia *dKO* con 8 semanas de vida, los cuales fueron intervenidos tal como se describe mas arriba. Como podemos ver, no hay diferencias en la activación de la degeneración Walleriana ( $352 \pm 24$  vainas de mielina intactas en el control vs  $349 \pm 31$  en el *dKO*;  $p = 0,941$ ) ([Figuras 23.A](#) y [23.B](#)). Por lo que concluimos que la eliminación *in vivo* de la *HDAC4* y la *HDAC5* en las SC no afecta a la degeneración Walleriana.

Para descartar que un posible retraso en la re-mielinización del *dKO* pudiera estar causada por un defecto en la eliminación de los restos de mielina y otros restos del tejido dañado, (potenciales inhibidores de la regeneración axonal) exploramos si hay diferencias en la activación del programa de reparación y el aclaramiento de la mielina, necesarios para la regeneración nerviosa, entre ambos genotipos. Para explorar el aclaramiento de la mielina empleamos ratones silvestres (*WT* procedentes de la colonia *KO\_5*), *dKO* y control hermanos de camada de la colonia *dKO* con 8 semanas de vida. Se les seccionó el nervio ciático, y fueron sacrificados 4, 7 o 10 días después. Sus nervios ciáticos no lesionados (*UI*) y lesionados fueron extraídos. De los nervios *UI* recogimos 1 cm, mientras que de los nervios lesionados recogimos los primeros 8 mm del muñón distal, los cuales fueron procesados para *Western blot*. Cuantificamos los niveles de proteína de c-Jun (factor de transcripción que regula el aclaramiento de la mielina) y Mpz (principal proteína, y la más abundante, que compone la mielina del SNP). Además, cuantificamos los niveles de Calnexin y Gpdh como controles internos de carga ([Figura 23.C](#)). La cuantificación densitométrica de c-Jun (normalizada a la señal de los 7 días después de la lesión en el *WT*) mostró que en los ratones *UI* no había diferencias ( $0,13 \pm 0,01$  au *WT* vs  $0,13 \pm 0,01$  control vs  $0,15 \pm 0,01$  au *dKO*;  $p = 0,164$ ), ni a los 4 días después de la lesión ( $0,93 \pm 0,06$  au *WT* vs  $0,89 \pm 0,11$  control vs  $1 \pm 0,01$  au *dKO*;  $p = 0,598$ ), ni a los 7 días después de la lesión ( $1 \pm 0$  au *WT* vs  $1,32 \pm 0,09$  control vs  $1,31 \pm 0,15$  au *dKO*;  $p = 0,111$ ), ni tampoco a los 10 días después de la lesión ( $0,9 \pm 0,03$  au *WT* vs  $0,92 \pm 0,11$  control vs  $0,81 \pm 0,15$  au *dKO*;  $p = 0,772$ ) ([Figura 23.D](#)). La cuantificación de Mpz (normalizada a la señal de los *UI* del *WT*), nos dió como resultado que no había diferencias en los niveles entre los *UI* ( $1 \pm 0$  au *WT* vs  $1,16 \pm 0,2$  control vs  $1,4 \pm 0,11$  au *dKO*;  $p = 0,190$ ), ni a los 4 días después de la lesión ( $0,71 \pm 0,06$  au *WT* vs  $0,87 \pm 0,19$  control vs  $0,96 \pm 0,21$  au *dKO*;  $p = 0,153$ ), ni a los 7 días después de la lesión ( $0,3 \pm 0,05$  au *WT* vs  $0,45 \pm 0,06$  control vs  $0,32 \pm 0,08$  au *dKO*;  $p = 0,384$ ), ni tampoco a los 10 días después de la lesión ( $0,16 \pm 0,02$  au *WT* vs  $0,12 \pm 0,02$  control vs  $0,13 \pm 0,02$  au *dKO*;  $p = 0,198$ ) ([Figura 23.E](#)). Concluimos por lo tanto que la eliminación *in vivo* de la *HDAC4* y la *HDAC5* en las SC no afecta al aclaramiento de la mielina.

También estudiamos si existía alguna alteración en la activación del programa de reparación de las SC después de la lesión en los ratones *dKO*. Para ello cuantificamos los niveles de expresión de mRNA mediante qPCR de algunos de los marcadores genéticos característicos del fenotipo reparador de las SC de los nervios ciáticos de ratones control y *dKO* a 1, 4 y 7 días después de lesionar el nervio ciático. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *dKO* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a una operación para cortar el nervio ciático. A diferentes tiempos después de la lesión (1, 4 y 7 días) fueron sacrificados y sus nervios ciáticos no lesionados (*UI*) y lesionados extraídos y procesados para qPCR. Los niveles de los mRNAs en los nervios lesionados de los ratones control y *dKO* fueron normalizados a los valores de los nervios *UI* de los mismos ratones. No detectamos diferencias en los niveles de *Gdnf* a 1 día después de la lesión ( $355,74 \pm 84,6$  fc control vs  $414,35 \pm 67,93$  fc *dKO*;  $p = 0,609$ ), ni a los 4 días después de la lesión ( $265,45 \pm 20,52$  fc control vs  $274,15 \pm 54,92$  fc *dKO*;  $p = 0,874$ ), ni tampoco a los 7 días después de la lesión ( $257,3 \pm 39,63$  fc control vs  $291,56 \pm 33,71$  fc *dKO*;  $p = 0,535$ ) (Figura 23.F). No detectamos diferencias en los niveles de *Olig-1* a 1 día después de la lesión ( $0,85 \pm 0,3$  fc control vs  $1,11 \pm 0,43$  fc *dKO*;  $p = 0,634$ ), ni a los 4 días después de la lesión ( $30,43 \pm 3,81$  fc control vs  $22,82 \pm 1,07$  fc *dKO*;  $p = 0,159$ ), ni tampoco a los 7 días después de la lesión ( $241,33 \pm 19,15$  fc control vs  $255,14 \pm 27,02$  fc *dKO*;  $p = 0,691$ ) (Figura 23.G). No detectamos diferencias en los niveles de *Shh* a 1 día después de la lesión ( $176,91 \pm 40,33$  fc control vs  $190,55 \pm 6,54$  fc *dKO*;  $p = 0,759$ ), ni a los 4 días después de la lesión ( $166,73 \pm 50,44$  fc control vs  $129,9 \pm 36,12$  fc *dKO*;  $p = 0,606$ ), ni tampoco a los 7 días después de la lesión ( $314,3 \pm 59,06$  fc control vs  $276,99 \pm 39,82$  fc *dKO*;  $p = 0,619$ ) (Figura 23.H). Por el contrario, detectamos mayores niveles de *c-Jun* a 1 día después de la lesión en el *dKO* ( $2,35 \pm 0,22$  fc control vs  $3,71 \pm 0,29$  fc *dKO*;  $p = 0,010$ ), que se igualaban a los 4 días después de la lesión ( $5,49 \pm 0,8$  fc control vs  $4,12 \pm 0,59$  fc *dKO*;  $p = 0,257$ ), y se mantenían igualados hasta al menos los 7 días después de la lesión ( $6,87 \pm 0,98$  fc control vs  $7,38 \pm 0,7$  fc *dKO*;  $p = 0,685$ ) (Figura 23.I). No detectamos diferencias en los niveles de *p75<sup>NTR</sup>* a 1 día después de la lesión ( $1,78 \pm 0,08$  fc control vs  $1,75 \pm 0,16$  fc *dKO*;  $p = 0,878$ ), ni a los 4 días después de la lesión ( $15,88 \pm 2,14$  fc control vs  $9,22 \pm 0,96$  fc *dKO*;  $p = 0,055$ ), ni tampoco a los 7 días después de la lesión ( $24,72 \pm 5,93$  fc control vs  $15,58 \pm 2,81$  fc *dKO*;  $p = 0,213$ ) (Figura 23.J). Nuestros datos mostraban pues, que si bien la eliminación *in vivo* de la *HDAC4* y la *HDAC5* acelera inicialmente la activación de la expresión de *c-Jun*, no se afecta significativamente la cinética de activación del programa de reparación de las SC.



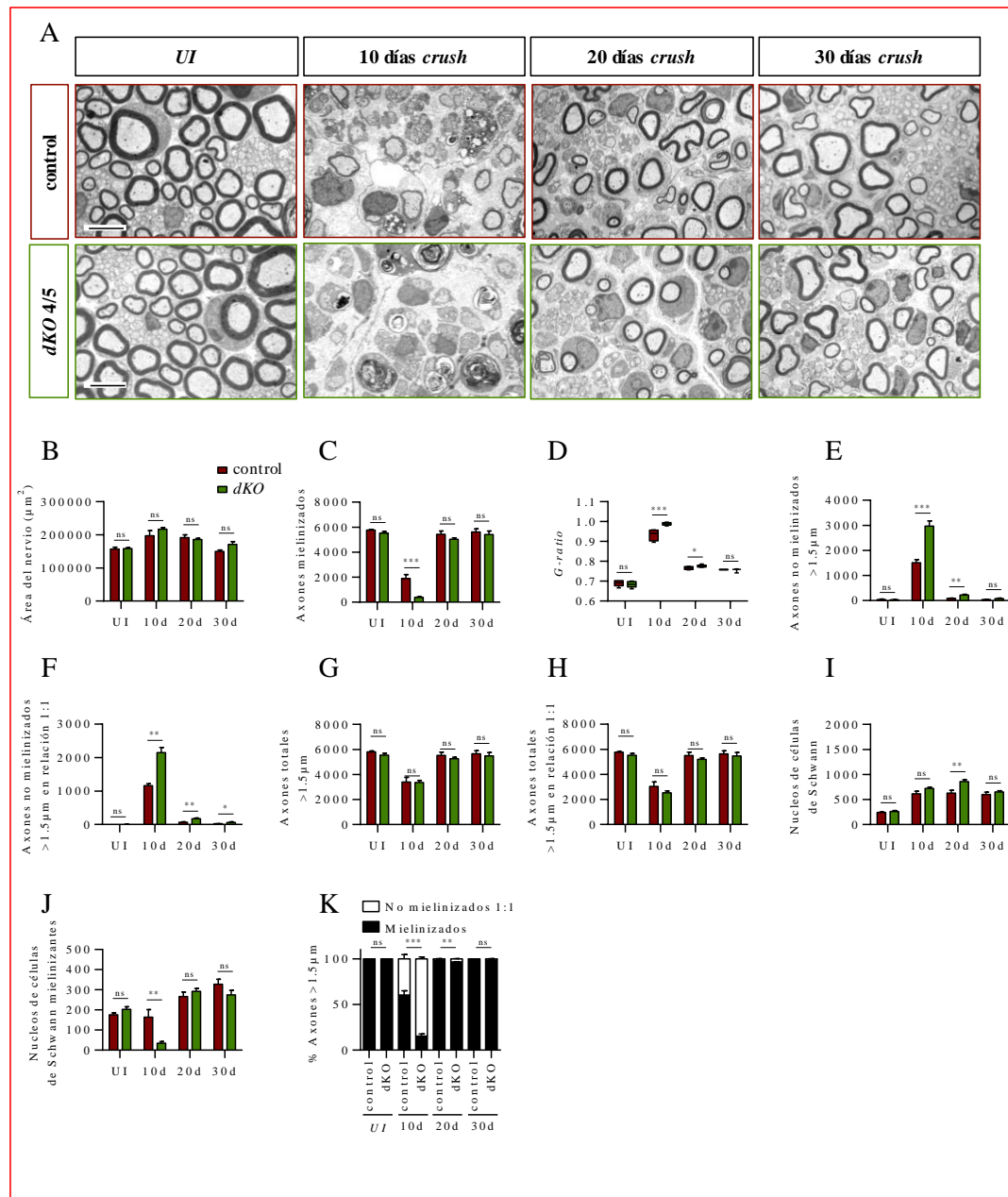
**Figura 23.** La eliminación *in vivo* simultánea de la *HDAC4* y la *HDAC5* en las SC no afecta a la activación de degeneración Walleriana, el aclaramiento de mielina ni a la activación del fenotipo reparador de las células de Schwann, tras la lesión del nervio ciático. **(A)** Imágenes de microscopía óptica de cortes transversales de nervios ciáticos teñidos con toluidina de ratones control (*P0-Cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>*) y *dKO* (*P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>*) a los 4 días después de la lesión tomadas a 63x. Las barras miden 5  $\mu$ m. **(B)** Número de vainas de mielina intactas en los nervios ciáticos de los ratones control y *dKO* tras 4 días de lesión (control  $n = 5$  y *dKO*  $n = 4$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. Gráfica de barras, con los puntos de cada muestra superpuestos, que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(C)** Western blot de los niveles de c-Jun, Mpz, Calnexin y Gpdh en los nervios ciáticos UI, 4, 7 y 10 días después de la lesión de los ratones WT, control y *dKO*. **(D-E)** Densitometría de los Westerns blots, UI (WT  $n = 1$ , control  $n = 1$  y *dKO*  $n = 1$ ), 4 días (WT  $n = 3$ , control  $n = 3$  y *dKO*  $n = 3$ ), 7 días (WT  $n = 3$ , control  $n = 3$  y *dKO*  $n = 3$ ) y 10 días (WT  $n = 3$ , control  $n = 3$  y *dKO*  $n = 3$ ). Los datos fueron analizados usando un ANOVA con un test de múltiples comparaciones Tukey. Gráfica de barras, con los puntos de cada muestra superpuestos, que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(D)** Niveles de c-Jun (au) en los nervios ciáticos UI, 4, 7 y 10 días después de la lesión de los ratones WT, control y *dKO*, normalizados a los 7 días después de la lesión del WT. **(E)** Niveles de MPZ (au) en los nervios ciáticos UI, 4, 7 y 10 días después de la lesión de los ratones WT, control y *dKO*, normalizados a los UI del WT. **(F-K)** Niveles de mRNA de los marcadores genéticos característicos del fenotipo reparador de las SC de los nervios ciáticos de ratones control y *dKO*

a 1, 4 y 7 días después de la lesión. Gráficas de puntos que muestran la media  $\pm$  el error estándar de los niveles de mRNA en el nervio lesionado normalizado a los niveles del nervio *UI* del mismo ratón. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas comparando los nervios ciáticos de los ratones control y *dKO* 1 día, 4 días y 7 días después de la lesión por separado. **(F)** *Gdnf* 1 día (control n = 4 y *dKO* n = 4), 4 días (control n = 4 y *dKO* n = 3) y 7 días (control n = 4 y *dKO* n = 4). **(G)** *Olig-1* 1 día (control n = 4 y *dKO* n = 4), 4 días (control n = 4 y *dKO* n = 3) y 7 días (control n = 4 y *dKO* n = 4). **(H)** *Shh* 1 día (control n = 4 y *dKO* n = 4), 4 días (control n = 4 y *dKO* n = 3) y 7 días (control n = 4 y *dKO* n = 4). **(I)** *c-Jun* 1 día (control n = 4 y *dKO* n = 4), 4 días (control n = 4 y *dKO* n = 3) y 7 días (control n = 4 y *dKO* n = 4). **(J)** *p75<sup>NTR</sup>* 1 día (control n = 4 y *dKO* n = 3), 4 días (control n = 4 y *dKO* n = 3) y 7 días (control n = 4 y *dKO* n = 4). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

Después, procedimos a estudiar el proceso de re-mielinización. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *dKO* (usando como controles los hermanos de camada de los *dKO* que son *KO\_5*) con 8 semanas de vida, los cuales fueron intervenidos tal como se describe mas arriba. Los ratones fueron sacrificados a los 10, 20 y 30 días tras la lesión y sus nervios fueron procesados para microscopía electrónica de transmisión (Figura 24.A). No se apreciaron diferencias en las áreas de los nervios ciáticos *UI* ( $157.184 \pm 5.744 \mu\text{m}^2$  control vs  $158.703 \pm 2.641 \mu\text{m}^2$  *dKO*; p = 0,804), ni a los 10 días después de la lesión ( $197.604 \pm 15.549 \mu\text{m}^2$  control vs  $216.999 \pm 5.342 \mu\text{m}^2$  *dKO*; p = 0,195), ni a los 20 días después de la lesión ( $191.436 \pm 8.517 \mu\text{m}^2$  control vs  $186.199 \pm 30.889 \mu\text{m}^2$  *dKO*; p = 0,559), ni tampoco a los 30 días después de la lesión ( $150.122 \pm 4.234 \mu\text{m}^2$  control vs  $171.300 \pm 8.256 \mu\text{m}^2$  *dKO*; p = 0,059) (Figura 24.B). No hubo diferencias en el número de axones mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $5.764 \pm 67$  en el control vs  $5.518 \pm 147$  en el *dKO*; p = 0,191). Por el contrario, a los 10 días después de la lesión cuantificamos muchos menos axones mielinizados en los *dKO* ( $1.889 \pm 330$  en el control vs  $388 \pm 55$  en el *dKO*; p < 0,001). Sin embargo, estas diferencias habian desaparecido a partir de los 20 días después de la lesión ( $5.437 \pm 258$  en el control vs  $5.036 \pm 107$  en el *dKO*; p = 0,159), y hasta al menos 30 días después de la lesión ( $5.614 \pm 248$  en el control vs  $5.412 \pm 274$  en el *dKO*; p = 0,612) (Figura 24.C). No detectamos diferencias en el *g-ratio* de los axones mielinizados de los nervios ciáticos *UI* ( $0,69 \pm 0,01$  en el control vs  $0,68 \pm 0,01$  en el *dKO*; p = 0,503), pero a los 10 días después de la lesión el *g-ratio* en los *dKO* fue mayor ( $0,92 \pm 0,01$  en el control vs  $0,96 \pm 0,01$  en el *dKO*; p = 0,002). Una ligera diferencia se encontró incluso a los 20 días después de la lesión ( $0,77 \pm 0,01$  en el control vs  $0,78 \pm 0,01$  en el *dKO*; p = 0,043), pero se normalizó a los 30 días después de la lesión ( $0,76 \pm 0,01$  en el control vs  $0,75 \pm 0,01$  en el *dKO*; p = 0,492) (Figura 24.D). No detectamos diferencias en el número de axones de más de 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC, no mielinizados, en los nervios ciáticos *UI* ( $46 \pm 14$  en el control vs  $33 \pm 14$  en el *dKO*; p = 0,517). En cambio, a los 10 días después de la lesión el número de estos en los *dKO* fue mayor que en los controles ( $1.612 \pm 119$  en el control vs  $2.969 \pm 203$  en el *dKO*; p < 0,001). También a los 20 días después de la lesión ( $88 \pm 14$  en el control vs  $224 \pm 25$  en el *dKO*; p = 0,002), mientras que a los 30 días después de la lesión no detectamos diferencias ( $43 \pm 11$  en el control vs  $81 \pm 18$  en el *dKO*; p = 0,122) (Figura 24.E). No encontramos diferencias en el número de axones de más de 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $4 \pm 1$  en el control vs  $5 \pm 2$  en el *dKO*; p = 0,598). Sin embargo a los 10 días después de la lesión este número en los *dKO* fue mayor que en los controles ( $1.158 \pm 57$  en el control vs  $2.148 \pm 155$  en el *dKO*; p = 0,001), manteniendose la diferencia a los 20 días después de la lesión ( $68 \pm 12$  en el

control vs  $175 \pm 20$  en el *dKO*;  $p = 0,002$ ), y también a los 30 días después de la lesión ( $22 \pm 6$  en el control vs  $63 \pm 16$  en el *dKO*;  $p = 0,043$ ) (Figura 24.F). No detectamos diferencias en el número total de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC en los nervios ciáticos *UI* ( $5.810 \pm 78$  en el control vs  $5.551 \pm 137$  en el *dKO*;  $p = 0,156$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $3.401 \pm 370$  en el control vs  $3.357 \pm 180$  en el *dKO*;  $p = 0,108$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $5.524 \pm 264$  en el control vs  $5.260 \pm 110$  en el *dKO*;  $p = 0,349$ ), ni tampoco a los 30 días después de la lesión ( $5.657 \pm 239$  en el control vs  $5.492 \pm 262$  en el *dKO*;  $p = 0,666$ ) (Figura 24.G). Tampoco detectamos diferencias en el número total de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) en los nervios ciáticos *UI* ( $5.767 \pm 68$  en el control vs  $5.523 \pm 147$  en el *dKO*;  $p = 0,193$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $3.047 \pm 350$  en el control vs  $2.536 \pm 155$  en el *dKO*;  $p = 0,169$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $5.504 \pm 265$  en el control vs  $5.210 \pm 101$  en el *dKO*;  $p = 0,294$ ), ni tampoco a los 30 días después de la lesión ( $5.636 \pm 245$  en el control vs  $5.475 \pm 277$  en el *dKO*;  $p = 0,682$ ) (Figura 24.H). No vimos diferencias en el número de núcleos de SC en los nervios ciáticos *UI* ( $243 \pm 9$  en el control vs  $262 \pm 12$  en el *dKO*;  $p = 0,393$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $615 \pm 50$  en el control vs  $724 \pm 22$  en el *dKO*;  $p = 0,054$ ). A los 20 días después de la lesión el número de núcleos de SC en los nervios ciáticos de los *dKO* fue mayor que en los controles ( $630 \pm 53$  en el control vs  $861 \pm 34$  en el *dKO*;  $p = 0,004$ ), mientras que no detectamos diferencias a los 30 días después de la lesión ( $602 \pm 47$  en el control vs  $654 \pm 22$  en el *dKO*;  $p = 0,415$ ) (Figura 24.I). Tampoco detectamos diferencias en el número de núcleos pertenecientes a SC mielinizantes en los nervios ciáticos *UI* ( $176 \pm 9$  en el control vs  $203 \pm 12$  en el *dKO*;  $p = 0,124$ ). Sin embargo, a los 10 días después de la lesión el número de núcleos de SC mielinizantes en los nervios ciáticos de los *dKO* fue menor que en los controles ( $164 \pm 37$  en el control vs  $35 \pm 8$  en el *dKO*;  $p = 0,003$ ), mientras que a los 20 días después de la lesión no detectamos diferencias ( $267 \pm 22$  en el control vs  $292 \pm 14$  en el *dKO*;  $p = 0,339$ ). Tampoco detectamos diferencias a los 30 días después de la lesión ( $328 \pm 24$  en el control vs  $275 \pm 22$  en el *dKO*;  $p = 0,181$ ) (Figura 24.J). Por último, no detectamos diferencias con respecto al porcentaje de axones mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $99,94 \pm 0,02$  % control vs  $99,91 \pm 0,04$  % *dKO*;  $p = 0,476$ ). En contraste, a los 10 días después de la lesión detectamos un menor porcentaje de los axones mielinizados en el *dKO* comparado con el control ( $60,42 \pm 4,77$  % control vs  $15,47 \pm 2,3$  % *dKO*;  $p < 0,001$ ), que se mantuvo hasta los 20 días después de la lesión, ( $98,79 \pm 0,2$  % control vs  $96,64 \pm 0,41$  % *dKO*;  $p = 0,002$ ), y se normalizaba a los 30 días ( $99,6 \pm 0,11$  % control vs  $98,85 \pm 0,3$  % *dKO*;  $p = 0,058$ ) (Figura 24.K).





**Figura 24. La eliminación simultánea de la *HDAC4* y la *HDAC5* en las células de Schwann *in vivo* produce un retraso en la re-mielinización después de la lesión del nervio ciático. (A)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los nervios ciáticos de ratones control (*P0-Cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>*) y *dKO* (*P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>*) UI y 10\_20\_30 días después de la lesión tomadas a 3.000x. Las barras miden 5  $\mu$ m. **(B\_K)** Análisis morfométrico de las imágenes de microscopía electrónica de los nervios ciáticos UI (control n = 5 y *dKO* n = 6), 10 días (control n = 4 y *dKO* n = 6), 20 días (control n = 5 y *dKO* n = 6) y 30 días después de la lesión (control n = 4 y *dKO* n = 3). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando los nervios ciáticos de los ratones control y *dKO* UI, 10 días, 20 días y 30 días después de la lesión por separado. Gráfica de barras que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(B)** Áreas totales de los nervios ciáticos UI y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. **(C)** Número de axones mielinizados por nervio ciático analizado UI y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. **(D)** Tukey's box plot del *g-ratio* de la mielina de los axones mielinizados de los nervios ciáticos UI y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. **(E)** Número de axones > 1,5  $\mu$ m de diámetro no mielinizados por nervio ciático analizado UI y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. **(F)** Número de axones > 1,5  $\mu$ m de diámetro sorteados por las SC no mielinizados por nervio ciático analizado UI y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. **(G)** Número total de axones > 1,5  $\mu$ m de diámetro por nervio ciático analizado UI y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. **(H)** Número total de axones > 1,5  $\mu$ m de diámetro sorteados por las

SC en una relación 1:1 por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. **(I)** Número de núcleos de SC por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. **(J)** Número de núcleos de mSC por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. **(K)** Porcentaje de axones mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Para caracterizar con más detalle el retraso en la remielinización observado mediante TEM, cuantificamos los niveles de proteínas de c-Jun, Krox20 y Mpz mediante *Western blot* a los 10 y 21 días después de lesionar el nervio ciático de los ratones control y *dKO*. Además, cuantificamos los niveles de Calnexin y Gapdh como controles internos de carga. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *dKO* con 8 semanas de vida, cuyos ciáticos se lesionaron mediante *crush*. Los ratones fueron sacrificados a diferentes tiempos después de la lesión (10 y 21 días) y sus nervios ciáticos procesados para *Western blot* tal como se describe en apartados previos (Figura 25.A). La cuantificación densitométrica de los *Western blot* de c-Jun normalizados a la señal de los 10 días después de la lesión del *WT* (ratón procedente de la colonia *KO\_5*), reveló que a los 10 días después de la lesión el nervio ciático del *dKO* expresa más c-Jun que el control (hermano de camada) ( $1,09 \pm 0,13$  au control vs  $1,72 \pm 0,17$  au *dKO*;  $p = 0,012$ ), mientras que a los 21 días ya no hay diferencias entre ambos ( $0,92 \pm 0,1$  au control vs  $1,32 \pm 0,16$  au *dKO*;  $p = 0,051$ ) (Figura 25.B). La cuantificación de Krox20 a los 10 días después de la lesión no mostró diferencias ( $1,11 \pm 0,09$  au control vs  $0,94 \pm 0,06$  au *dKO*;  $p = 0,150$ ), ni tampoco la de los 21 días ( $1,11 \pm 0,06$  au control vs  $1,08 \pm 0,06$  au *dKO*;  $p = 0,729$ ) (Figura 25.C). Por último, la cuantificación de Mpz mostró que no existen diferencias entre los ratones control y *dKO* a los 10 días después de la lesión ( $0,15 \pm 0,01$  au control vs  $0,14 \pm 0,01$  au *dKO*;  $p = 0,168$ ), mientras que a los 21 hay menos Mpz en el *dKO* ( $0,4 \pm 0,02$  au control vs  $0,32 \pm 0,02$  au *dKO*;  $p = 0,020$ ) (Figura 25.D).

También cuantificamos mediante qPCR los niveles de expresión de reguladores negativos (*c-Jun*, *Runx2*, *Gdnf*, *Bdnf*, *Sox2*, *Olig1* y *Shh*) y positivos (*Oct-6*, *Krox20*, *Prx*, *Mpz* y *Mbp*) de la mielinización. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *dKO* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos al modelo de *crush*. Tras 10 días después de la lesión los ratones fueron sacrificados y sus nervios ciáticos procesados para qPCR tal como se describe en apartados anteriores. No detectamos diferencias en los niveles de los mRNAs de *Runx2* ( $14,66 \pm 2,33$  fc control vs  $12,4 \pm 19,03$  fc *dKO*;  $p = 0,319$ ) (Figura 25.F), *Oct-6* ( $7,89 \pm 0,82$  fc control vs  $5,94 \pm 0,29$  fc *dKO*;  $p = 0,055$ ) (Figura 25.G), *Sox2* ( $4,74 \pm 0,49$  fc control vs  $3,81 \pm 0,28$  fc *dKO*;  $p = 0,122$ ) (Figura 25.N) y *Shh* ( $9,14 \pm 1,72$  fc control vs  $10,65 \pm 1,55$  fc *dKO*;  $p = 0,524$ ) (Figura 25.O). Sin embargo detectamos mayores niveles de los mRNAs de *c-Jun* ( $2,74 \pm 0,2$  fc control vs  $4,15 \pm 0,3$  fc *dKO*;  $p = 0,006$ ) (Figura 25.E), *Gdnf* ( $30,9 \pm 2,34$  fc control vs  $57,05 \pm 5,89$  fc *dKO*;  $p = 0,003$ ) (Figura 25.L), *Bdnf* ( $12,74 \pm 2,71$  fc control vs  $33,12 \pm 4,11$  fc *dKO*;  $p = 0,001$ ) (Figura 25.M) y *Olig1* ( $165,15 \pm 22,29$  fc control vs  $263,54 \pm 23,13$  fc *dKO*;  $p = 0,008$ ) (Figura 25.Ñ) en los ratones *dKO*. Por último detectamos menores niveles de los mRNAs de *Krox20* ( $0,43 \pm 0,06$  fc control vs  $0,2 \pm 0,02$  fc *dKO*;  $p = 0,007$ ) (Figura 25.H), *Prx* ( $0,22 \pm 0,02$  fc control vs  $0,1 \pm 0,01$  fc *dKO*;  $p = 0,001$ ) (Figura 25.I), *Mpz* ( $0,22 \pm 0,03$  fc control vs  $0,08 \pm 0,01$  fc *dKO*;  $p = 0,005$ ) (Figura 25.J) y *Mbp* ( $0,15 \pm 0,03$  fc control vs  $0,05 \pm 0,01$  fc *dKO*;  $p = 0,012$ ) (Figura 25.K) en los ratones *dKO* comparados con los control.

Los resultados obtenidos mediante *Westerns blot* y qPCR confirmaron los datos que obtuvimos mediante TEM, y sugieren que la eliminación *in vivo* de la *HDAC4* y la *HDAC5* en las SC desreprime a los reguladores negativos de la mielinización causando el retraso en la activación del programa de re-mielinización.

En resumen, nuestros datos demuestran que que la eliminación *in vivo* de la *HDAC4* y la *HDAC5* de las SC desreprime la expresión de los reguladores negativos de la mielinización, causando un retraso en la re-mielinización axonal. Sin embargo, este retraso se recupera posteriormente, y la re-mielinización se acaba desarrollando con normalidad pasados los 20 días.

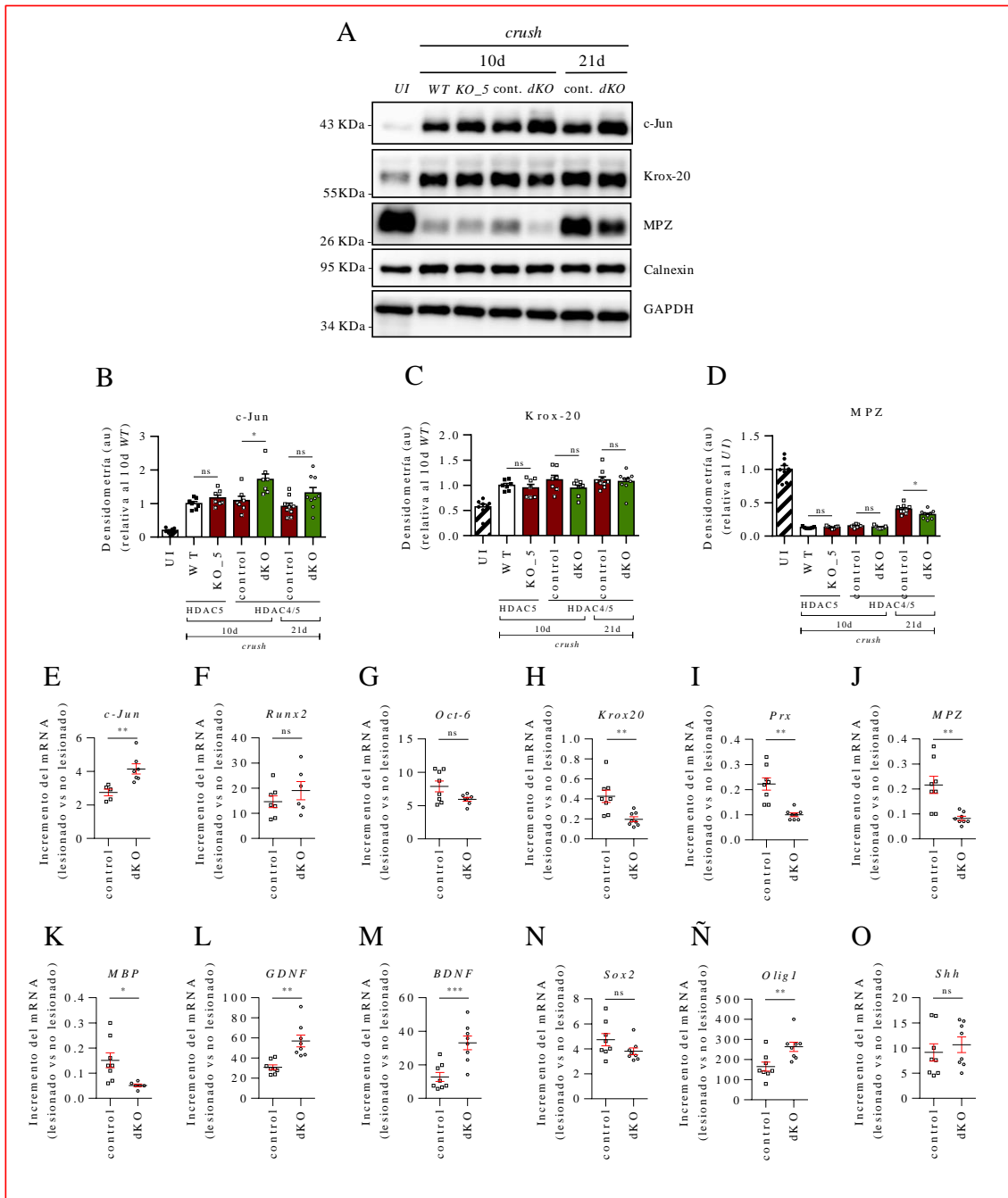


Figura 25. La eliminación *in vivo* de la *HDAC4* y la *HDAC5* en las SC reduce el silenciamiento de los reguladores negativos de la mielinización después de la lesión, causando el retraso en la

**activación del programa de re-mielinización, pero no afecta a la regeneración axonal. (A)** *Western blot* de los niveles de c-Jun, Krox-20, MPZ, Calnexin y Gapdh en los nervios ciáticos *UI* y 10 días después de la lesión de los ratones *WT*, *KO\_5* (*HDAC5<sup>-/-</sup>*), control (*P0-Cre<sup>-/-</sup>*; *HDAC4<sup>flx/flx</sup>*; *HDAC5<sup>-/-</sup>*) y *dKO* (*P0-Cre<sup>+/-</sup>*; *HDAC4<sup>flx/flx</sup>*; *HDAC5<sup>-/-</sup>*), además de 21 días después de la lesión de los ratones control y *dKO*. **(B\_D)** Análisis densitométrico de los Westerns Blots, *UI* (*WT* n = 2, *KO\_5* n = 2, control n = 2 y *dKO* n = 2), 10 días (*WT* n = 7, *KO\_5* n = 7, control n = 7 y *dKO* n = 7) y 21 días (control n = 9 y *dKO* n = 9). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando ratones *WT* y *KO\_5* a 10 días, control y *dKO* a 10 y 21 días después de la lesión por separado. Gráfica de barras, con los puntos de cada muestra superpuestos, que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(B)** Niveles de c-Jun (au) en los nervios ciáticos *UI*, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones *WT*, *KO\_5*, control y *dKO*, normalizados a los 10 días después de la lesión del *WT*. **(C)** Niveles de Krox20 (au) en los nervios ciáticos *UI*, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones *WT*, *KO\_5*, control y *dKO*, normalizados a los 10 días después de la lesión del *WT*. **(D)** Niveles de MPZ (au) en los nervios ciáticos *UI*, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones *WT*, *KO\_5*, control y *dKO*, normalizados a los *UI*. **(E-O)** Niveles de mRNA mediante qPCR de reguladores negativos y positivos de la mielinización de los nervios ciáticos de ratones control y *dKO* a 10 días después de la lesión. Gráficas de puntos que muestran la media  $\pm$  el error estándar de los niveles de mRNA en el nervio lesionado normalizado a los niveles del nervio *UI* del mismo ratón. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. **(E)** *c-Jun* (control n = 5 y *dKO* n = 7). **(F)** *Runx2* (control n = 7 y *dKO* n = 6). **(G)** *Oct-6* (control n = 8 y *dKO* n = 7). **(H)** *Krox20* (control n = 8 y *dKO* n = 8). **(I)** *Prx* (control n = 8 y *dKO* n = 8). **(J)** *MPZ* (control n = 8 y *dKO* n = 8). **(K)** *MBP* (control n = 8 y *dKO* n = 6). **(L)** *GDNF* (control n = 8 y *dKO* n = 8). **(M)** *BDNF* (control n = 8 y *dKO* n = 8). **(N)** *Sox2* (control n = 8 y *dKO* n = 8). **(Ñ)** *Olig1* (control n = 8 y *dKO* n = 8). **(O)** *Shh* (control n = 8 y *dKO* n = 8). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

## 18. Efectos de la eliminación simultánea de las HDAC4/5/7 en la re-mielinización del SNP después de la lesión.

Como ya he mostrado con anterioridad, el retraso en la mielinización postnatal de los ratones *dKO* se magnifica si eliminamos además a la HDAC7 de las células de Schwann. Este resultado es coherente con la capacidad de las proteínas de esta familia para compensarse funcionalmente entre ellas cuando falla la expresión de alguna de ellas (Parra, 2015; Parra and Verdin, 2010). Razonamos pues que la recuperación de la remielinización a partir de los 20 días tras la lesión observada en los *dKO* podría ser consecuencia de la actividad de la HDAC7. Por este motivo nos decidimos a estudiar la capacidad de regeneración y re-mielinización de los ratones *tKO* (*P0-Cre<sup>+/-</sup>*; *HDAC4<sup>flx/flx</sup>*; *HDAC5<sup>-/-</sup>*; *HDAC7<sup>flx/flx</sup>*) y sus hermanos de camada controles (*P0-Cre<sup>-/-</sup>*; *HDAC4<sup>flx/flx</sup>*; *HDAC5<sup>-/-</sup>*; *HDAC7<sup>flx/flx</sup>*).

Primero estudiamos si la eliminación *in vivo* de la HDAC4, la HDAC5 y la HDAC7 en las SC causaba alteraciones en la activación de la degeneración Walleriana. Para ello, empleamos ratones de la colonia *tKO* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a una operación para cortar el nervio ciático. Cuatro días después de la operación los ratones fueron sacrificados y los nervios ciáticos procesados tal como se ha descrito más arriba. Como podemos ver, hay diferencias en la activación de la degeneración Walleriana (Figura 26.A), siendo mucho mayor en los ratones *tKO* (274  $\pm$  8 vainas de mielina intactas en el control vs 150  $\pm$  7 en el *tKO*; p < 0,001) (Figura 26.B). Nuestros datos demuestran que la eliminación *in vivo* de la HDAC4, la HDAC5 y la HDAC7 en las SC acelera la degeneración Walleriana tras la lesión.

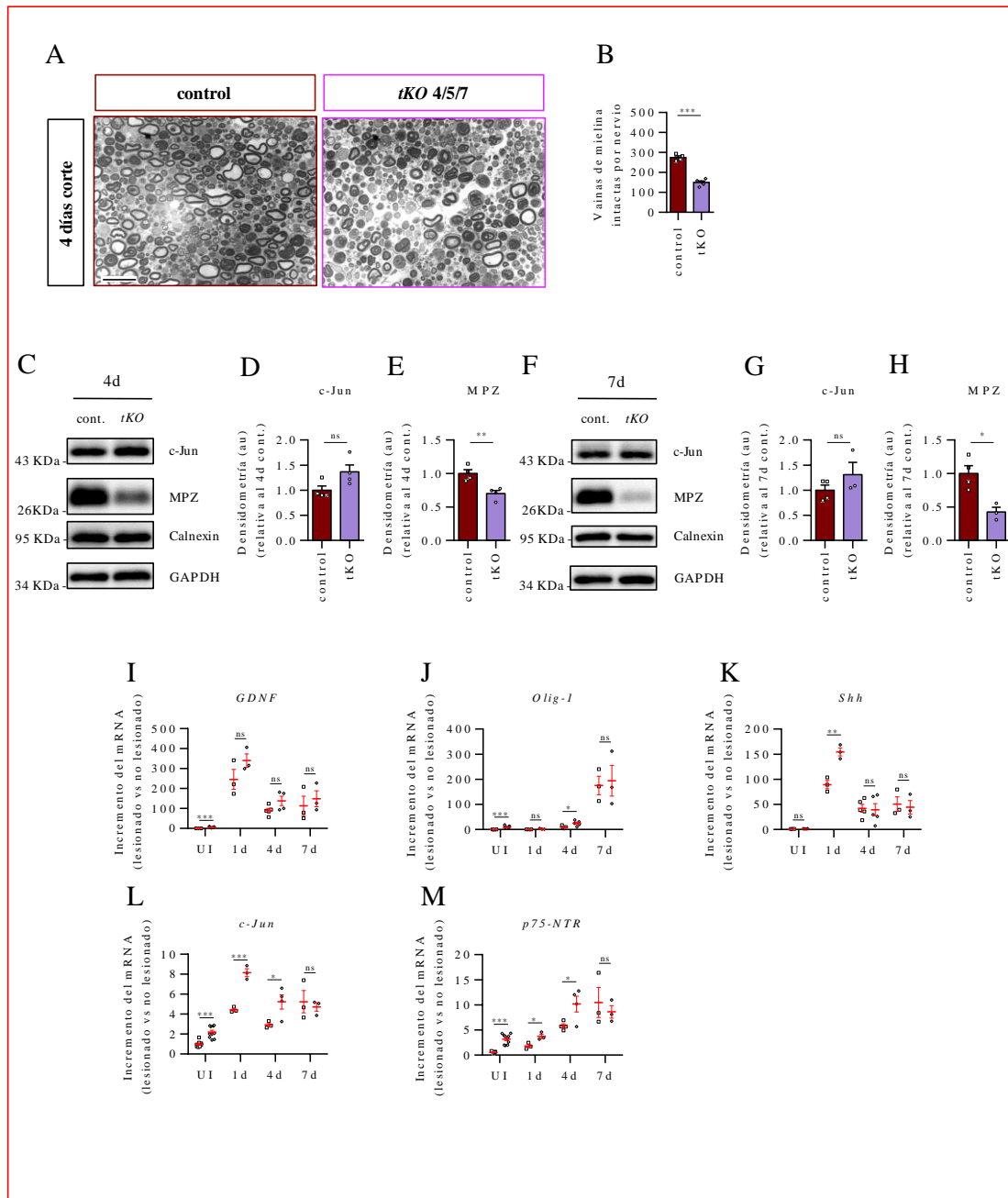
También cuantificamos el estado de los mecanismos que aclaran la mielina en el *tKO*. Para ello, empleamos ratones de la colonia *tKO* con 8 semanas de vida, a los cuales seccionamos el nervio ciático. A diferentes tiempos después de la lesión (4 y 7 días) fueron sacrificados los ratones y sus nervios ciáticos procesados para *Western blot*. Como se ha descrito más arriba, para determinar el aclaramiento de la mielina,

cuantificamos los niveles de proteína de c-Jun (factor de transcripción que regula este proceso) y de Mpz (principal componente proteico de la mielina del SNP). También cuantificamos los niveles de Calnexin y Gapdh como controles internos de carga (Figuras 26.C y 26.F). La cuantificación densitométrica de los *Western blot* de c-Jun normalizados a la señal de los controles demostró que los *tKO* expresan niveles de c-Jun semejantes al de los controles a los 4 días ( $1 \pm 0,08$  control vs  $1,37 \pm 0,14$  au *tKO*;  $p = 0,066$ ) (Figura 26.D), y a los 7 días después de la lesión ( $1 \pm 0,1$  control vs  $1,31 \pm 0,24$  au *tKO*;  $p = 0,246$ ) (Figura 26.G). La cuantificación de MPZ normalizados a la señal de los controles demostró que el *tKO* tiene un mayor aclaramiento de la mielina a los 4 días ( $1 \pm 0,06$  control vs  $0,7 \pm 0,05$  au *tKO*;  $p = 0,006$ ) (Figura 26.E), y a los 7 días después de la lesión ( $1 \pm 0,12$  control vs  $0,43 \pm 0,07$  au *tKO*;  $p = 0,012$ ) (Figura 26.H). Concluimos por lo tanto que la eliminación *in vivo* de la *HDAC4*, la *HDAC5* y la *HDAC7* en las SC, si bien no incrementa los niveles de c-Jun, acelera significativamente al aclaramiento de la mielina.

También estudiamos si existía alguna alteración en la activación del programa de reparación de las SC después de la lesión. Para ello cuantificamos los niveles de expresión de algunos de los marcadores genéticos característicos del fenotipo reparador de las SC en los nervios ciáticos. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *tKO* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a una operación para cortar el nervio ciático. Los ratones fueron sacrificados a diferentes tiempos después de la lesión (1, 4 y 7 días) y sus nervios ciáticos procesados para qPCR. Los niveles de los mRNAs de los ratones control y *tKO* fueron normalizados a los valores de los nervios *UI* de los ratones control. Detectamos diferencias en los niveles de *Gdnf* en los *UI* ( $1 \pm 0,13$  au control vs  $5,3 \pm 0,68$  au *tKO*;  $p < 0,001$ ), mientras que no detectamos diferencias a 1 día después de la lesión ( $245,57 \pm 49,9$  au control vs  $340,5 \pm 33,61$  au *tKO*;  $p = 0,190$ ), ni a los 4 días después de la lesión ( $89,87 \pm 10,84$  au control vs  $127,87 \pm 23,72$  au *tKO*;  $p = 0,088$ ), ni tampoco a los 7 días después de la lesión ( $112,99 \pm 48,56$  au control vs  $148,82 \pm 40,35$  au *tKO*;  $p = 0,601$ ) (Figura 26.I). Por otra parte, observamos diferencias en los niveles de *Olig-1* en los *UI* ( $0,39 \pm 0,09$  au control vs  $8,48 \pm 1,49$  au *tKO*;  $p < 0,001$ ) pero no detectamos diferencias a 1 día después de la lesión ( $0,43 \pm 0,09$  au control vs  $2,23 \pm 0,94$  au *tKO*;  $p = 0,130$ ). De nuevo encontramos diferencias a los 4 días ( $9,47 \pm 2,24$  au control vs  $25,16 \pm 4,5$  au *tKO*;  $p = 0,014$ ), mientras que no detectamos diferencias a los 7 días después de la lesión ( $175,3 \pm 36,87$  au control vs  $194,37 \pm 61,58$  au *tKO*;  $p = 0,804$ ) (Figura 26.J). En cuanto a *Shh*, no detectamos diferencias en los *UI* ( $1 \pm 0,12$  au control vs  $1,26 \pm 0,11$  au *tKO*;  $p = 0,120$ ), pero sí a 1 día después de la lesión ( $89,39 \pm 8,25$  au control vs  $154,58 \pm 8,01$  au *tKO*;  $p = 0,005$ ). Las diferencias desaparecían a 4 días ( $42,33 \pm 7,71$  au control vs  $39,39 \pm 11,92$  au *tKO*;  $p = 0,841$ ), y a los 7 días después de la lesión ( $50,57 \pm 14,71$  au control vs  $44,36 \pm 13,44$  au *tKO*;  $p = 0,771$ ) (Figura 26.K). Detectamos un aumento en los niveles de *c-Jun* en los *UI* ( $1 \pm 0,11$  au control vs  $2,19 \pm 0,19$  au *tKO*;  $p < 0,001$ ), a 1 día después de la lesión ( $4,44 \pm 0,15$  au control vs  $8,16 \pm 0,39$  au *tKO*;  $p < 0,001$ ), y a los 4 días después de la lesión ( $2,93 \pm 0,2$  au control vs  $5,23 \pm 0,71$  au *tKO*;  $p = 0,044$ ), mientras que no detectamos diferencias a los 7 días después de la lesión ( $5,24 \pm 1,12$  au control vs  $4,71 \pm 0,43$  au *tKO*;  $p = 0,682$ ) (Figura 26.L). Finalmente, detectamos diferencias en *p75<sup>NTR</sup>* en los *UI* ( $0,55 \pm 0,05$  au control vs  $3,19 \pm 0,31$  au *tKO*;  $p < 0,001$ ), a 1 día después de la lesión

( $1,82 \pm 0,36$  au control vs  $3,74 \pm 0,43$  au *tKO*;  $p = 0,027$ ), y a los 4 días después de la lesión en el *tKO* comparado con el control ( $5,82 \pm 0,42$  au control vs  $10,17 \pm 1,59$  au *tKO*;  $p = 0,038$ ). Las diferencias desaparecían a los 7 días después de la lesión ( $10,48 \pm 3$  au control vs  $8,63 \pm 1,26$  au *tKO*;  $p = 0,599$ ) (Figura 26.M).

En conjunto, nuestros datos sugieren que la eliminación *in vivo* simultánea de la *HDAC4*, la *HDAC5* y la *HDAC7* en las SC, favorece una rápida activación del programa de reparación tras la lesión, que se ve porbablemente potenciada al partir de unos niveles basales mayores (en los UI del *tKO*) de *Gdnf*, *Olig-1*, *c-Jun* y *p75<sup>NTR</sup>*.



**Figura 26.** La eliminación *in vivo* simultánea de la *HDAC4*, la *HDAC5* y la *HDAC7* en las SC acelera la degeneración Walleriana, el aclaramiento de la mielina y la activación del fenotipo reparador de las SC después de la lesión del nervio ciático. **(A)** Imágenes de microscopía óptica de los nervios ciáticos de ratones control ( $P0\text{-Cre}^{-/-}; HDAC4^{flx/flx}; HDAC5^{-/-}; HDAC7^{flx/flx}$ ) y *tKO* ( $P0\text{-Cre}^{-/-}; HDAC4^{flx/flx}; HDAC5^{-/-}; HDAC7^{flx/flx}$ ) 4 días después de la lesión tomadas a 63x. Las barras miden 5  $\mu\text{m}$ . **(B)** Número de

vainas de mielina intactas en los nervios ciáticos de los ratones control y *tKO* 4 días después de la lesión (control  $n = 4$  y *tKO*  $n = 5$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. Gáfica de barras, con los puntos de cada muestra superpuestos, que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(C)** *Western blot* de los niveles de c-Jun, Mpz, Calnexin y Gapdh en los nervios ciáticos 4 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(D-E)** Densitometría de los *Western blot* 4 días (control  $n = 4$  y *tKO*  $n = 4$ ) y 7 días (control  $n = 4$  y *tKO*  $n = 4$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. Gáfica de barras, con los puntos de cada muestra superpuestos, que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(D)** Niveles de c-Jun (au) en los nervios ciáticos 4 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*, normalizados a los 4 días después de la lesión del control. **(E)** Niveles de Mpz (au) en los nervios ciáticos 4 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*, normalizados a los 4 días control. **(F)** *Western blot* de los niveles de c-Jun, Mpz, Calnexin y Gapdh en los nervios ciáticos 7 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(G-H)** Densitometría de los *Westerns blot* 7 días (control  $n = 4$  y *tKO*  $n = 4$ ). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. Gáfica de barras, con los puntos de cada muestra superpuestos, que muestran la media  $\pm$  el error estándar. **(G)** Niveles de c-Jun (au) en los nervios ciáticos 7 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*, normalizados a los 7 días después de la lesión del control. **(H)** Niveles de Mpz (au) en los nervios ciáticos 7 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*, normalizados a los 7 días control. **(I-M)** Niveles de mRNA mediante qPCR de los marcadores genéticos característicos del fenotipo reparador de las SC de los nervios ciáticos de ratones control y *tKO* *UI*, 1, 4 y 7 días después de la lesión normalizado a los niveles del nervio *UI* del control. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar con los puntos de cada experimento. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas comparando los nervios ciáticos de los ratones control y *tKO* *UI*, 1 día, 4 días y 7 días después de la lesión por separado. **(I)** *GDNF UI* (control  $n = 10$  y *tKO*  $n = 11$ ), 1 día (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 3$ ), 4 días (control  $n = 5$  y *tKO*  $n = 4$ ) y 7 días (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 3$ ). **(J)** *Olig-1 UI* (control  $n = 10$  y *tKO*  $n = 11$ ), 1 día (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 3$ ), 4 días (control  $n = 5$  y *tKO*  $n = 5$ ) y 7 días (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 3$ ). **(K)** *Shh UI* (control  $n = 11$  y *tKO*  $n = 11$ ), 1 día (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 3$ ), 4 días (control  $n = 5$  y *tKO*  $n = 5$ ) y 7 días (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 3$ ). **(L)** *c-Jun UI* (control  $n = 8$  y *tKO*  $n = 10$ ), 1 día (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 3$ ), 4 días (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 4$ ) y 7 días (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 3$ ). **(M)** *p75<sup>NTR</sup> UI* (control  $n = 9$  y *tKO*  $n = 10$ ), 1 día (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 3$ ), 4 días (control  $n = 4$  y *tKO*  $n = 4$ ) y 7 días (control  $n = 3$  y *tKO*  $n = 3$ ). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

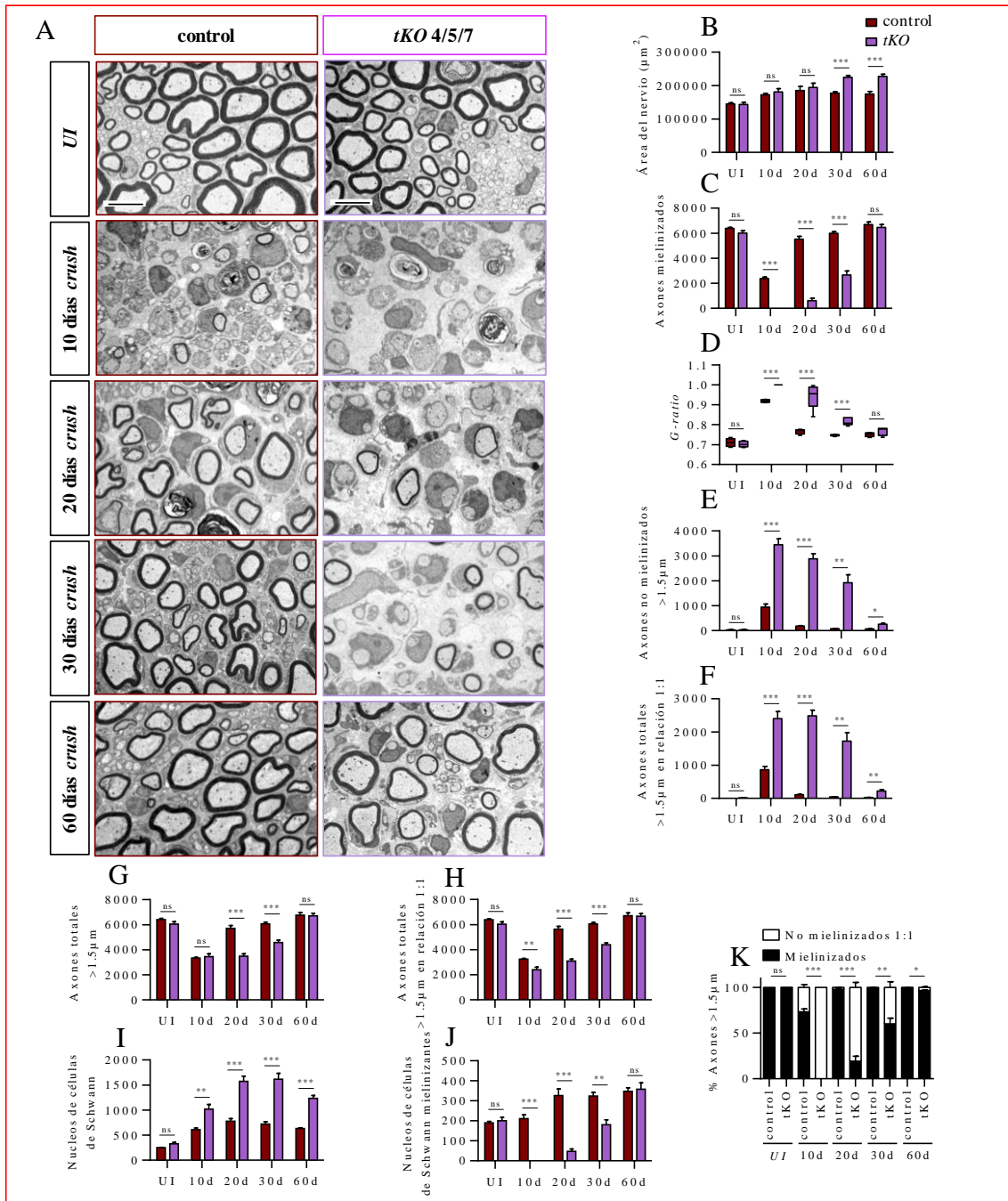
A continuación, procedimos a estudiar el proceso de re-mielinización. Para estos experimentos empleamos ratones de la colonia *tKO* con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a un *crush* del nervio ciático. Los ratones fueron sacrificados a diferentes tiempos después de la lesión (10, 20, 30 y 60 días) y sus nervios ciáticos procesados para microscopía electrónica de transmisión (Figura 27.A). No se apreciaron diferencias en las áreas de los nervios ciáticos *UI* ( $144.946 \pm 3.525 \mu\text{m}^2$  control vs  $143.975 \pm 6.289 \mu\text{m}^2$  *tKO*;  $p = 0,897$ ), ni a los 10 días después de la lesión ( $172.795 \pm 4.233 \mu\text{m}^2$  control vs  $181.092 \pm 9.511 \mu\text{m}^2$  *tKO*;  $p = 0,456$ ), ni a los 20 días después de la lesión ( $185.383 \pm 11.910 \mu\text{m}^2$  control vs  $194.679 \pm 12.303 \mu\text{m}^2$  *tKO*;  $p = 0,602$ ). Sin embargo, las áreas de los *tKO* fueron mayores que las de los controles a los 30 días ( $177.410 \pm 4.592 \mu\text{m}^2$  control vs  $224.649 \pm 5.800 \mu\text{m}^2$  *tKO*;  $p < 0,001$ ), y a los 60 días después de la lesión ( $174.833 \pm 7.817 \mu\text{m}^2$  control vs  $227.951 \pm 6.391 \mu\text{m}^2$  *tKO*;  $p < 0,001$ ) (Figura 27.B). No encontramos diferencias en el número de axones mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $6.382 \pm 90$  en el control vs  $6.020 \pm 175$  en el *tKO*;  $p = 0,116$ ). Sin embargo, observamos notables diferencias a los 10 días ( $2.383 \pm 112$  en el control vs  $0 \pm 0$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), a los 20 días ( $5.525 \pm 222$  en el control vs  $606 \pm 200$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), manteniéndose una clara diferencia hasta los 30 días después de la lesión ( $6.003 \pm 124$  en el control vs  $2.659 \pm 323$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ). De nuevo las diferencias desaparecía, pero esta vez a partir de los 60 días después de la lesión ( $6.690 \pm 212$  en el control vs  $6.458 \pm 240$  en el *tKO*;  $p = 0,491$ ) (Figura 27.C). Por otra parte, no detectamos diferencias en el *g-ratio* de los axones mielinizados de los nervios ciáticos *UI* ( $0,71 \pm 0,01$  en el control vs  $0,7 \pm 0,01$  en el *tKO*;  $p = 0,516$ ). Sin embargo, sí vimos diferencias en el *g-ratio* 10 días después de la

lesión ( $0,92 \pm 0,01$  en el control vs  $1 \pm 0$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), 20 días después de la lesión ( $0,77 \pm 0,01$  en el control vs  $0,94 \pm 0,03$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), y 30 días después de la lesión ( $0,75 \pm 0,01$  en el control vs  $0,82 \pm 0,01$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ). De nuevo el *g-ratio* se normalizó a los 60 días después de la lesión ( $0,75 \pm 0,01$  en el control vs  $0,77 \pm 0,01$  en el *tKO*;  $p = 0,195$ ) (Figura 27.D). No detectamos diferencias en el número de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC no mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $33 \pm 7$  en el control vs  $36 \pm 12$  en el *tKO*;  $p = 0,854$ ). En contraste, si vimos notables diferencias a los 10 días ( $950 \pm 116$  en el control vs  $3.447 \pm 236$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), a los 20 días ( $184 \pm 15$  en el control vs  $2.885 \pm 208$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), a los 30 días ( $76 \pm 16$  en el control vs  $1.925 \pm 319$  en el *tKO*;  $p = 0,005$ ), e incluso a los 60 días después de la lesión ( $69 \pm 11$  en el control vs  $258 \pm 43$  en el *tKO*;  $p = 0,010$ ) (Figura 27.E). De nuevo no detectamos diferencias, en el número de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $2 \pm 1$  en el control vs  $16 \pm 6$  en el *tKO*;  $p = 0,105$ ). Sin embargo a los 10 días ( $864 \pm 102$  en el control vs  $2.405 \pm 209$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), a los 20 días ( $110 \pm 13$  en el control vs  $2.487 \pm 170$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), a los 30 días ( $43 \pm 8$  en el control vs  $1.728 \pm 251$  en el *tKO*;  $p = 0,003$ ), y a los 60 días después de la lesión ( $27 \pm 5$  en el control vs  $224 \pm 43$  en el *tKO*;  $p = 0,010$ ), el número de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) no mielinizados en los nervios ciáticos del *tKO* fue mayor que en el control (Figura 27.F). No detectamos diferencias en el número total de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC en los nervios ciáticos *UI* ( $6.415 \pm 94$  en el control vs  $6.057 \pm 184$  en el *tKO*;  $p = 0,134$ ), ni a los 10 días ( $3.333 \pm 63$  en el control vs  $3.447 \pm 236$  en el *tKO*;  $p = 0,655$ ). Sin embargo, sí encontramos diferencias a los 20 días ( $5.709 \pm 228$  en el control vs  $3.491 \pm 184$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ) y 30 días después de la lesión ( $6.080 \pm 131$  en el control vs  $4.584 \pm 184$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), donde contamos un menor número total de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC en los *tKO*. Las diferencias desaparecieron a los 60 días después de la lesión ( $6.758 \pm 221$  en el control vs  $6.716 \pm 198$  en el *tKO*;  $p = 0,890$ ) (Figura 26.G). Tampoco detectamos diferencias en el número total de axones de más de  $1,5 \mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC (en una relación 1:1) en los nervios ciáticos *UI* ( $6.383 \pm 89$  en el control vs  $6.036 \pm 181$  en el *tKO*;  $p = 0,136$ ). Sí vimos diferencias claras a los 10 días ( $3.247 \pm 60$  en el control vs  $2.405 \pm 209$  en el *tKO*;  $p = 0,008$ ), a los 20 días ( $5.635 \pm 233$  en el control vs  $3.093 \pm 147$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ) y a los 30 días ( $6.046 \pm 127$  en el control vs  $4.387 \pm 158$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ) después de la lesión. De nuevo estas diferencias desaparecían a los 60 días después de la lesión ( $6.717 \pm 213$  en el control vs  $6.682 \pm 198$  en el *tKO*;  $p = 0,908$ ) (Figura 27.H). No detectamos diferencias en el número de núcleos de SC en los nervios ciáticos *UI* ( $253 \pm 4$  en el control vs  $329 \pm 28$  en el *tKO*;  $p = 0,071$ ), mientras que sí las vimos a los 10 días ( $609 \pm 33$  en el control vs  $1017 \pm 95$  en el *tKO*;  $p = 0,007$ ), a los 20 días ( $779 \pm 54$  en el control vs  $1.576 \pm 100$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), a los 30 días ( $722 \pm 47$  en el control vs  $1.618 \pm 116$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), y a los 60 días después de la lesión ( $632 \pm 13$  en el control vs  $1.237 \pm 53$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ) (Figura 27.I). Tampoco detectamos diferencias en el número de núcleos pertenecientes a SC mielinizantes en los nervios ciáticos *UI* ( $191 \pm 7$  en el control vs  $201 \pm 17$  en el *tKO*;  $p = 0,589$ ). Sin embargo, si había notables diferencias a los 10 días ( $211 \pm 19$  en el control vs  $0 \pm 0$  en el *tKO*;  $p <$



0,001), a los 20 días ( $326 \pm 33$  en el control vs  $48 \pm 12$  en el *tKO*;  $p < 0,001$ ), y a los 30 días después de la lesión ( $325 \pm 17$  en el control vs  $181 \pm 24$  en el *tKO*;  $p = 0,001$ ). Las diferencias desaparecían a los 60 días después de la lesión ( $348 \pm 18$  en el control vs  $358 \pm 31$  en el *tKO*;  $p = 0,783$ ) (Figura 27.J). Por último, no detectamos diferencias con respecto al porcentaje de axones mielinizados en los nervios ciáticos *UI* ( $99,97 \pm 0,02$  % control vs  $99,75 \pm 0,09$  % *tKO*;  $p = 0,091$ ), mientras que a los 10 días ( $73,39 \pm 3,13$  % control vs  $0 \pm 0$  % *tKO*;  $p < 0,001$ ), 20 días ( $98,07 \pm 0,17$  % control vs  $19,16 \pm 5,5$  % *tKO*;  $p < 0,001$ ), 30 días ( $99,29 \pm 0,14$  % control vs  $60,29 \pm 6,13$  % *tKO*;  $p = 0,003$ ), y 60 días después de la lesión ( $99,59 \pm 0,08$  % control vs  $96,57 \pm 0,72$  % *tKO*;  $p = 0,014$ ) detectamos menos porcentaje de axones mielinizados en los *tKO* (Figura 27.K).

Nuestros datos mostraban pues que la eliminación *in vivo* simultánea de la *HDAC4*, *HDAC5* y *HDAC7* en las SC provoca un notable retraso en el proceso de remielinización después de la lesión del nervio ciático.



**Figura 27. La eliminación *in vivo* de la HDAC4, la HDAC5 y la HDAC7 en las células de Schwann no afecta al proceso de regeneración axonal, pero producen un elevado retraso en la re-mielinización después de la lesión del nervio ciático. (A)** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los nervios ciáticos de ratones control (*P0-Cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>; HDAC7<sup>flx/flx</sup>*) y *tKO* (*P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>; HDAC7<sup>flx/flx</sup>*) UI y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión tomadas a 3.000x. Las barras miden 5 μm. **(B\_K)** Análisis morfométrico de las imágenes de microscopía electrónica de los nervios ciáticos UI (control n = 4 y *tKO* n = 4), 10 días (control n = 4 y *tKO* n = 4), 20 días (control n = 5 y *tKO* n = 5), 30 días (control n = 5 y *tKO* n = 5) y 60 días después de la lesión (control n = 5 y *tKO* n = 5). Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas, comparando los nervios ciáticos de los ratones control y *tKO* UI, 10 días, 20 días, 30 días y 60 días después de la lesión por separado. Gráfica de barras que muestran la media ± el error estándar. **(B)** Áreas totales de los nervios ciáticos UI y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(C)** Número de axones mielinizados por nervio ciático analizado UI y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(D)** Tukey's box plot del *g-ratio* de la mielina de los axones mielinizados de los nervios ciáticos UI y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(E)** Número de axones > 1,5 μm de diámetro no mielinizados por nervio ciático analizado UI y

10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(F)** Número de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC no mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(G)** Número total de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(H)** Número total de axones > 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro sorteados por las SC en una relación 1:1 por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(I)** Número de núcleos de SC por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(J)** Número de núcleos de mSC por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. **(K)** Porcentaje de axones mielinizados por nervio ciático analizado *UI* y 10\_20\_30\_60 días después de la lesión de los ratones control y *tKO*. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

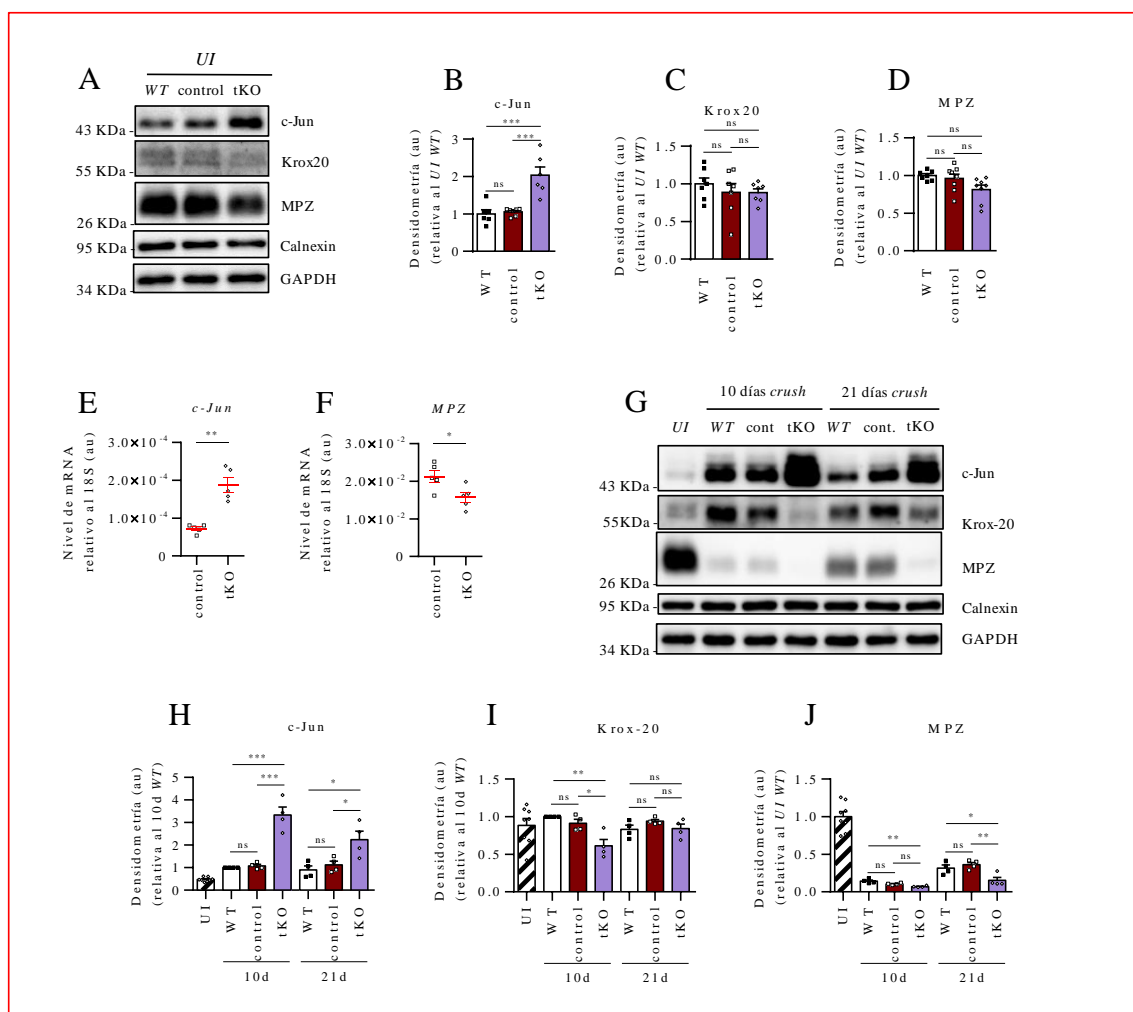
A continuación, cuantificamos los niveles de proteínas de c-Jun, Krox20 y Mpz mediante *Western blot* a los 10 y 21 días después de lesionar el nervio ciático de los ratones control y *tKO*. Además, cuantificamos los niveles de Calnexin y Gapdh como controles internos de carga. Para estos experimentos empleamos ratones control (*KO\_5* hermanos de camada) y *tKO* de la colonia *tKO*, además de ratones silverstres (*WT*) (previnientes de la colonia *KO\_5*) con 8 semanas de vida, los cuales fueron sometidos a *crush* de sus nervios ciáticos. A diferentes tiempos después de la lesión (10 y 21 días) los ratones fueron sacrificados y sus nervios ciáticos procesados para *Western blot*.

Primero realizamos *Western blot* cargando solo muestras de los nervios *UI* de los ratones *WT*, control y *tKO* (Figura 28.A). La cuantificación densitométrica de los *Western blots* de c-Jun normalizados a la señal de los *UI* del *WT* (ratón procedente de la colonia *KO\_5*), nos dió como resultado que en los *UI* del *tKO* había mayores niveles de c-Jun que en el *UI* control (hermano de camada) y en el *UI* *WT* ( $1 \pm 0,11$  au *WT* vs  $1,05 \pm 0,04$  au control vs  $2,04 \pm 0,22$  au *tKO*; ANOVA  $p < 0,001$ ) (Figura 28.B). La cuantificación de Krox20 no mostró diferencias significativas entre los *UI* *tKO*, los *UI* control (hermano de camada) y los *UI* *WT* ( $1 \pm 0,08$  au *WT* vs  $0,89 \pm 0,11$  au control vs  $0,89 \pm 0,05$  au *tKO*; ANOVA  $p = 0,061$ ) (Figura 28.C). Lo mismo ocurrió con Mpz ( $1 \pm 0,02$  au *WT* vs  $0,98 \pm 0,06$  au control vs  $0,81 \pm 0,07$  au *tKO*; ANOVA  $p = 0,047$ ) (Figura 28.D). Para determinar con más detalle las posibles diferencias realizamos QPCRs de los nervios *UI*. Detectamos niveles más altos de *c-Jun* en el *tKO* ( $7,208 \times 10^{-5} \pm 4,98 \times 10^{-6}$  au control vs  $1,879 \times 10^{-4} \pm 1,897 \times 10^{-5}$  au *tKO*;  $p = 0,003$ ) (Figura 28.E) y niveles ligeramente más bajos de *MPZ* ( $0,021 \pm 0,002$  au control vs  $0,016 \pm 0,001$  au *tKO*;  $p = 0,027$ ) (Figura 28.F). Nuestros datos muestran pues que la eliminación *in vivo* de las tres de las HDACs de la clase IIa incrementa significativamente la expresión del regulador negativo de la mielinización c-Jun, lo cual disminuye ligeramente la expresión de Mpz, pero no tiene efecto apreciable en el grado de mielinización, determinado mediante TEM.

A continuación, determinamos los cambios en los niveles de las proteínas c-Jun, Krox20 y Mpz tras la lesión mediante *Western blot*. La cuantificación densitométrica de los *Western blots* de c-Jun normalizados a la señal de los 10 días después de la lesión del *WT* (ratón procedente de la colonia *KO\_5*), mostró que a los 10 días había claramente más c-Jun en *tKO* que en el control (hermano de camada) y el *WT* ( $1 \pm 0$  au *WT* vs  $1,07 \pm 0,07$  au control vs  $3,34 \pm 0,35$  au *tKO*; ANOVA  $p < 0,001$ ), diferencia que se mantiene a los 21 días después de la lesión ( $0,9 \pm 0,17$  au *WT* vs  $1,12 \pm 0,16$  au control vs  $2,25 \pm 0,38$  au *tKO*; ANOVA  $p = 0,010$ ) (Figura 28.H). La cuantificación de Krox20 demostró que a los 10 días en el *tKO* había menos Krox20

que en el control y el WT ( $1 \pm 0$  au WT vs  $0,91 \pm 0,05$  au control vs  $0,61 \pm 0,08$  au tKO; ANOVA  $p = 0,002$ ), mientras que no hay diferencias 21 días después de la lesión ( $0,83 \pm 0,06$  au WT vs  $0,94 \pm 0,02$  au control vs  $0,84 \pm 0,06$  au tKO; ANOVA  $p = 0,279$ ) (Figura 28.I). Por último, la cuantificación de Mpz evidenció que tanto a los 10 días ( $0,14 \pm 0,02$  au WT vs  $0,11 \pm 0,01$  au control vs  $0,07 \pm 0,01$  au tKO; ANOVA  $p = 0,002$ ), como a los 21 días hay una menor expresión de Mpz que en el control y el WT ( $0,32 \pm 0,04$  au WT vs  $0,36 \pm 0,03$  au control vs  $0,15 \pm 0,04$  au tKO; ANOVA  $p = 0,009$ ) (Figura 28.J).

En conjunto nuestros datos demuestran pues que la eliminación *in vivo* simultánea de la HDAC4, la HDAC5 y la HDAC7 en las SC reduce el silenciamiento de los reguladores negativos de la mielinización causando un notable retraso en la activación del programa de re-mielinización de los nervios periféricos tras la lesión.



**Figura 28.** La eliminación *in vivo* simultánea de la HDAC4, la HDAC5 y la HDAC7 en las células de Schwann no afecta al proceso de regeneración axonal, pero producen un notable retraso en la re-mielinización después de la lesión del nervio ciático. **A** Western blot de los niveles de c-Jun, Krox-20, MPZ, Calnexin y Gapdh en los nervios ciáticos UI de los ratones WT, control y tKO. **(B-D)** Densitometría de los Westerns blot (WT n = 7, control n = 7 y tKO n = 7). Los datos fueron analizados usando un ANOVA con una prueba de múltiples comparaciones de Tukey. Se muestra gráfica de barras de la media  $\pm$  el error estándar, con los puntos de cada experimento. **(B)** Niveles de c-Jun (au) en los nervios ciáticos UI de los

ratones *WT*, control y *tKO*, normalizados a los *UI* del *WT*. **(C)** Niveles de Krox20 (au) en los nervios ciáticos *UI* de los ratones *WT*, control y *tKO*, normalizados a los *UI* del *WT*. **(D)** Niveles de Mpz (au) en los nervios ciáticos *UI* de los ratones *WT*, control y *tKO*, normalizados a los *UI* del *WT*. **(E\_F)** Niveles de mRNA de *c-Jun* y *Mpz* de los nervios ciáticos *UI* de ratones control y *tKO* de 8 semanas. Gráficas de puntos con la media  $\pm$  el error de los niveles de mRNA normalizados a 18S. Los datos fueron analizados mediante una prueba paramétrica y no pareada, usando el test de Student a dos colas. **(E)** *c-Jun* (control  $n = 5$  y *tKO*  $n = 5$ ). **(F)** *Mpz* (control  $n = 5$  y *tKO*  $n = 5$ ). **(G)** *Western blot* de *c-Jun*, Krox-20, Mpz, Calnexin y *Gapdh* en los nervios ciáticos *UI* (solo *WT*), 10 y 21 días después de la lesión de los ratones *WT*, control y *tKO*. **(H\_J)** Densitometría de los *Westerns blot*, *UI* (*WT*  $n = 8$ ), 10 días (*WT*  $n = 4$ , control  $n = 4$  y *tKO*  $n = 4$ ) y 21 días (*WT*  $n = 4$ , control  $n = 4$  y *tKO*  $n = 4$ ). Los datos fueron analizados usando un ANOVA con una prueba de múltiples comparaciones de Tukey, comparando los 10 y 21 días después de la lesión por separado. Se muestra gráfica de barras de la media  $\pm$  el error estándar, con los puntos de cada experimento. **(H)** Niveles de *c-Jun* (au) en los nervios ciáticos *UI*, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones *WT*, control y *tKO*, normalizados a los 10 días después de la lesión del *WT*. **(I)** Niveles de Krox20 (au) en los nervios ciáticos *UI*, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones *WT*, control y *tKO*, normalizados a los 10 días después de la lesión del *WT*. **(J)** Niveles de Mpz (au) en los nervios ciáticos *UI*, 10 y 21 días después de la lesión de los ratones *WT*, control y *tKO*, normalizados a los *UI* del *WT*. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

## DISCUSIÓN

Durante el desarrollo postnatal, la activación de la Gpr126 induce la actividad de la adenilato ciclasa, incrementado la concentración intracelular del cAMP en las células de Schwann. Esto estimula la diferenciación a mSC y la generación de la vaina de mielina (Glenn and Talbot, 2013b; Mogha et al., 2013; Mogha et al., 2016; Monk et al., 2009; Monk et al., 2011; Paavola et al., 2014; Petersen et al., 2015). Se ha demostrado *in vitro* que el cAMP produce diferentes efectos en las células de Schwann en función de la concentración a la que se aplique. A bajas concentraciones (0,2 – 5  $\mu$ M FSK o <100  $\mu$ M dbcAMP) favorece los efectos mitogénicos de la NRG1, mientras que a altas concentraciones (10  $\mu$ M FSK o 1 mM dbcAMP) induce la diferenciación a célula de Schwann pro-mielinizante (Arthur-Farraj et al., 2011; Limpert and Carter, 2010; Monje et al., 2009; Morgan et al., 1991). Se ha propuesto que los elevados niveles de cAMP en las células de Schwann acaban produciendo la activación de la PKA y la EPAC (Bacallao and Monje, 2013), pero actualmente se desconoce cuál es el mecanismo molecular preciso que lo conecta con la activación de la expresión de los genes de la mielina.

El programa de mielinización de las células de Schwann está controlado por reguladores transcripcionales positivos (*Krox20*, *Oct-6*, *Sox10* y *Yy1*), y por reguladores transcripcionales negativos (*c-Jun*, *Sox2*, *Ednrb*, *Id1* y *Notch*) (Jessen et al., 2015a; Jessen et al., 2015b; Sock and Wegner, 2019). Aunque todavía faltan muchos detalles por aclarar, *Krox20* se perfila como el factor de transcripción necesario y suficiente para activar la expresión de los genes de la mielina (como *Mbp*, *Mpz*, y *Prx*) (Parkinson et al., 2004; Topliko et al., 1994). Para que *Krox20* se pueda expresar en las células de Schwann primero se debe de bloquear la expresión de inhibidores como *c-Jun* (Parkinson et al., 2008). A continuación, *Sox10* y *Oct-6* se deben de unir a su promotor para que se inicie la expresión (Svaren and Meijer, 2008).

Después de producirse una lesión en el SNP, las células de Schwann pierden el contacto con los axones y se empieza a expresar *c-Jun*, lo cual provoca su reprogramación a células de reparación (Jessen and Arthur-Farraj, 2019; Jessen and Mirsky, 2016, 2019b; Kim et al., 2013). El factor de transcripción *c-Jun* bloquea la mielinización al inhibir la expresión de *Krox20* e induce la expresión de genes de reparación y factores neurotróficos que favorecen la regeneración axonal (*Artemina*, *Bdnf*, *Gdnf*, *Olig1*, *Ngf* y *Shh*) (Arthur-Farraj et al., 2012; Parkinson et al., 2008). También activa la eliminación de los restos de mielina y del tejido lesionado (aclaramiento de la mielina) al inducir la síntesis de citoquinas que reclutan macrófagos. La expresión de *c-Jun* también estimula la milelinofagia (autofagia de la mielina por las propias células de Schwann) (Gomez-Sanchez et al., 2015), además de activar la proliferación celular y la formación de los tractos de regeneración por donde van a volver a crecer los axones (*Bungner's bands*) (Gomez-Sanchez et al., 2017). Los axones regenerados vuelven a contactar con las células de Schwann provocando de nuevo la activación del programa de mielinización dando lugar a la remielinización del SNP (Sock and Wegner, 2019).

Resulta claro pues que la expresión de *c-Jun* es clave para determinar el fenotipo que vayan a adquirir las células de Schwann tanto durante el desarrollo como tras las lesiones nerviosas. Al realizar una búsqueda bibliográfica sobre como se

regula *c-Jun* en otros tipos celulares, encontramos que en las células del músculo liso de los vasos sanguíneos (*VSMC* del inglés *vascular smooth muscle cells*, que al igual que las células de Schwann derivan de las células de la cresta neural ([Woodhoo and Sommer, 2008](#))) responden a la lesión vascular incrementando la expresión de *c-Jun*, el cual provoca su reprogramación hacia un “fenotipo de activación” que contribuye a la reparación vascular ([Owens et al., 2004a](#)). Es pues un mecanismo similar al que ocurre en las células de Schwann después de una lesión. Interesantemente esta reprogramación de las *VSMC* se bloquea por el cAMP. En este tipo celular se ha demostrado que el aumento del cAMP activa a la PKA, la cual fosforila a la proteína quinasa SIK1, desactivándola. Esto inhibe la fosforilación de la HDAC4, impidiendo su retención citoplasmática por la proteína 14-3-3, y favorece la translocación nuclear de la HDAC4. Esta, al unirse a Mef2 en el promotor de *c-Jun*, bloquea su transcripción ([Gordon et al., 2009](#)).

Nosotros hemos observado que solo una alta concentración de dbcAMP o FSK, suficiente para la diferenciación a mSC, produce la traslocación al núcleo de la HDAC4 ([Figura 5F](#)). Nuestros datos muestran que esta traslocación nuclear de la HDAC4 está en parte mediada por la fosforilación directa, por la PKA, de la Ser265 y la Ser266 de la HDAC4 ([Figura 6.B y 6.D](#)). Además, tenemos evidencias que sugieren que hay implicados otros mecanismos, ya que la mutación de estas serinas por alaninas en los sitios consenso de fosforilación por la PKA disminuye, pero no bloquea completamente, la capacidad del cAMP para translocar la HDAC4 ([Figura 6.B](#)). En esa misma línea, hemos visto que el cAMP es más eficiente que la activación de la PKA (mediante la co-transfección de su dominio catalítico) para translocar la HDAC4-GFP al núcleo de las células de Schwann ([Figura 6.E](#)).

Mediante los experimentos de pérdida de función de la HDAC4, realizados con tecnología *short hairpin RNA*, hemos descubierto que la eliminación de la HDAC4 en las células de Schwann ([Figura 7.A](#)) provoca una disminución de la capacidad pro-diferenciadora del cAMP, ya que desaparece su capacidad de bloquear la expresión de *c-Jun* ([Figura 7.D](#)). Nuestros datos sugieren que la HDAC4, una vez dentro del núcleo de las células de Schwann, se une al promotor de *c-Jun* ([Figura 8.A](#)) desacetilando las histonas ([Figura 8.B](#)), lo que provoca el bloqueo de su expresión.

La HDAC4 no se une directamente al DNA, sino que emplea diferentes dominios de unión a factores de transcripción, tales como Mef2 ([Gordon et al., 2009](#)) o Runx2 ([Shimizu et al., 2014](#)). Nosotros hemos demostrado que, en el caso de las células de Schwann, el bloqueo por la HDAC4 de la expresión de *c-Jun* es independiente de Mef2. Aunque hemos visto que en las células de Schwann la HDAC4 sí se une a Mef2, la eliminación de los sitios de unión de la HDAC4 a Mef2 (mutaciones Leu175Ala o Val179Ala en la HDAC4) ([Han et al., 2005](#)) no afecta a su capacidad para bloquear la expresión de *c-Jun* ([Figura 8.E y 8.F](#)). En la actualidad estamos realizando experimentos de ChIP-seq sobre la HDAC4 endógena, para realizar un mapa de los sitios de unión de esta proteína en el genoma de las células de Schwann. Tenemos la esperanza de que esto nos facilite la identificación de los genes que son directamente regulados por la HDAC4, y tal vez nos permita definir un motivo de unión que podamos emplear para identificar al factor(es) de transcripción al que se une.

Aunque la HDAC4 no tiene actividad desacetilasa (Lahm et al., 2007), se ha visto que en algunos tipos celulares es capaz de reclutar a la HDAC3, que sí la tiene (Emiliani et al., 1998), formando un complejo en el que intervienen, entre otros, los correpresores NCoR1 y SMRT (Fischer et al., 2002). En el caso de las células de Schwann hemos demostrado que la HDAC4 forma también un complejo con NCoR1 y HDAC3 (Figura 9.A), y que la eliminación de la capacidad de formación de este complejo (mediante la introducción de la mutación His803Ala o Asp934Asn) disminuye la capacidad de la HDAC4 para bloquear la expresión de *c-Jun* (Figura 9.C). Esta disminución no es completa, lo que apunta a que debe haber otro mecanismo implicado en el bloqueo de la expresión de *c-Jun* por la HDAC4. Para poder desvelarlo hemos previsto inmunoprecipitar la HDAC4 endógena de las células de Schwann de rata en cultivo (diferenciadas con 1 mM dbcAMP) y realizar un análisis proteómico mediante espectrometría de masas, para identificar el interactoma de la HDAC4 en estas células.

Mediante los experimentos de ganancia de función (empleando la HDAC4 3SA) descubrimos que la activación de la HDAC4 detiene la proliferación celular (Figura 10.A) y provoca un cambio de la morfología de las células de Schwann, que pasan de una forma bipolar con núcleos pequeños, típica de las células de Schwann de reparación, a una morfología más achatada con núcleos más grandes asociada a las células de Schwann pro-mielinizantes (Monje et al., 2009) (Figura 10.C). Lo más importante, la forma activa de la HDAC4 induce la expresión de *Krox20* (Figura 10.E), el gen maestro del programa de diferenciación de las células de Schwann. Los datos transcriptómicos (Figura 10.F), nos confirmaron que la introducción de la HDAC4 dentro de los núcleos de las células de Schwann baja los niveles de *c-Jun* y los genes regulados por él (*Gdnf*, *Artemina*, *Olig1* y *Runx2*), provocando la activación del programa genético de la mielinización al inducir la expresión de *Krox20* y los genes de la mielina (*Drp2*, *Prx*, *Mpz*, *Pmp22*, *Mbp*, *Plp* y *Hmgcr*). Nuestros datos mostraban claramente que la HDAC4 provoca la activación del programa de mielinización. Sin embargo, los pequeños cambios de los niveles de *Mbp* y la ausencia de diferencias en la expresión de *Plp* nos hacen pensar que no todos los genes de la mielina deben estar regulados por la HDAC4, y debe haber otros mecanismos implicados. En el laboratorio seguimos trabajando en su identificación.

En resumen, nuestros experimentos en células de Schwann en cultivo sugieren que al incrementarse los niveles de cAMP (probablemente por la activación de Gpr126), se produce la traslocación al núcleo de la HDAC4, donde recluta a HDAC3 y NCoR1 y se une al promotor de *c-Jun* bloqueando su expresión (Fisher, 2002). El bloqueo de *c-Jun* permite la expresión de *Krox20* y la consecuente activación del programa genético de la mielinización (Figura 11.A).

Para poner a prueba este modelo de trabajo, realizamos experimentos de pérdida de función de la HDAC4 en las células de Schwann de ratón *in vivo*. Para ello establecimos una colonia de ratones *cKO\_4* cruzando el ratón *HDAC4<sup>flx/flx</sup>* (Potthoff et al., 2007) con el ratón *P0-Cre<sup>+/-</sup>* (Feltri et al., 1999) (Figura 11.F). En la microscopía electrónica de estos ratones *cKO\_4* a P2 detectamos una deficiencia en la mielinización axonal (Figura 12.D), que conlleva a un menor porcentaje de axones mielinizados (Figura 12.J), que se mantiene hasta P8.



Curiosamente, aunque a P2 en el *cKO\_4* hay menos axones mielinizados (Figura 12.D), las cuantificaciones del número de células de Schwann mielinizantes no son diferentes a los del control hermano de camada (Figura 12.I), lo cual es sorprendente. No tenemos explicación de este fenómeno, aunque es posible que sea debido a que la diferencia en el número de axones mielinizados no es muy grande, y sea por lo tanto difícil de constatar una diferencia cuando contamos los núcleos que pertenecen a células de Schwann mielinizantes, siempre más escasos por motivos topológicos debido a la morfología alargada de las células de Schwann mielinizante (575,9  $\mu\text{m}$ ) (Gomez-Sanchez et al., 2017) y al tipo de corte (sección transversal) la probabilidad de encontrar el núcleo de las SC en un axón mielinizado es de aproximadamente el 0.26 %. Es posible que encontráramos diferencias si aumentáramos la *n*. A nivel transcripcional, aunque detectamos una deficiencia en el silenciamiento de reguladores negativos de la mielinización (*c-Jun* y *Runx2*), no vimos diferencias en el nivel de expresión de los genes de la mielina (*Krox-20*, *Prx*, *Mpz* y *Hmgcr*) (Figuras 12.L y 12.M). En conjunto nuestros datos muestran que la HDAC4 contribuye a la regulación del proceso de mielinización pero de una manera muy limitada (Figura 12.B).

Se ha descrito que algunos tejidos expresan más de una de las cuatro HDACs de la clase IIa. Este solapamiento se cree está relacionado con el establecimiento de un mecanismo de compensación genética (Parra, 2015; Parra and Verdin, 2010). Así por ejemplo en el caso del músculo esquelético donde se expresan las *HDAC4*, *HDAC5* y *HDAC7*, solo la eliminación de 4 o más alelos de estos genes genera un cambio en la distribución del tipo de fibras rápidas y lentas (Potthoff et al., 2007). En las células de Schwann de ratones silvestres (cepa *C57BL/6*) observamos que además de *HDAC4*, se expresan la *HDAC5* y la *HDAC7* (Figura 11.B). Razonamos que la compensación podía pues explicar la ausencia de un fenotipo fuerte en los ratones *cKO\_4*. Para comprobar si este era el caso, decidimos eliminar varias de estas deacetilasas de manera simultánea de las células de Schwann. Como paso previo comprobamos que la eliminación de la *HDAC5* en los ratones *HDAC5<sup>-/-</sup>* (Chang et al., 2004) (Figura 11.G) no causa alteraciones en el proceso de mielinización (Figura 13.B). A continuación, demostramos que la eliminación de la *HDAC7* (en el ratón *cKO\_7*) tampoco afecta de manera notable al proceso de mielinización (Figura 14.A), ya que si bien detectamos un aumento en la expresión de *c-Jun* y *Runx2* en las células de Schwann, esto no es suficiente para provocar alteraciones en la expresión de los genes de la mielina ni efectos evidentes desde el punto de vista de la ultraestructura de la mielina.

Llegados a este punto generamos un ratón condicional *dKO* para las *HDAC4* y *HDAC5*. Interesantemente, y de manera similar a lo que ocurre en el músculo, la eliminación de los 4 alelos de manera simultánea produce un fenotipo claro. Así, en la microscopía electrónica de estos ratones *dKO* a P2 detectamos una disminución en el número total de axones mielinizados (Figura 15.C), que se refleja en un menor porcentaje de axones mielinizados (Figura 15.I). Además, a P8 en el *dKO* se mantiene un menor porcentaje de axones mielinizados. También hay que destacar que, aunque a P2 hay menos axones mielinizados (Figura 15.C) en el *dKO*, las cuantificaciones del número de células de Schwann mielinizantes no son diferentes a los del control

hermano de camada (Figura 15.H), posiblemente por el mismo motivo que expuse para el *cKO\_4*.

En conjunto nuestros resultados morfológicos muestran que en el ratón *dKO* existe un retraso en la transición de célula de Schwann pro-mielinizante a mSC que se hace evidente a P2. Este retraso se mantiene hasta P8 (Figura 15.A), y se normaliza después manteniéndose al menos hasta P60 (ver UI de la Figura 24). La cuantificación de los mRNA mediante qPCR confirmaron esta idea. Así a P0 vimos como en el *dKO* había una desrepresión de *c-Jun*, posible causa del déficit en la expresión de *Krox-20*, y del consecuente retraso en la expresión de los genes de la mielina (*Prx*, *Pmp22*, *Mpz*, *Mbp*, *Mag* y *Hmgcr*) (Figura 15.J). A P2 los niveles de *c-Jun* se mantuvieron altos y algunos genes de la mielina (como *Prx*, *Mpz*, *Mbp* y *Hmgcr*) bajos. Curiosamente *Krox20* se expresa ya con normalidad, lo que explicaría que ciertos genes de la mielina, como *Pmp22* y *Mag*, también comenzaran a hacerlo (Figura 15.K). Aparentemente podría parecer incongruente que a P2 existan niveles normales de *Krox20* mientras que la expresión de algunos genes de la mielina siguen bajos. Esto es posiblemente consecuencia a la cinética de expresión de estos genes y a la estabilidad de sus mRNAs. Hay que recordar que a P0 la expresión de *Krox20* está disminuida, y es posible que, aunque a P2 esta ya sea normal, no haya transcurrido el tiempo suficiente para que los niveles de algunos de los genes controlados por este factor de transcripción alcancen los niveles normales, y permitan una maduración de la mielina adecuada. A P2 vemos también una desrepresión de *Runx2*, otro de los reguladores negativos de la mielinización. Interesantemente, la expresión de este factor de transcripción está controlada por *c-Jun* (Hung et al., 2015). Además, nosotros hemos visto mediante experimentos de ChIP, que, junto a *Gdnf*, *Runx2* es una diana directa de la HDAC4 en las células de Schwann (ver Figuras Suplementarias S8 A y B del artículo adjunto (Gomis-Coloma et al., 2018)). Actualmente estamos trabajando en la identificación de la relación entre *c-Jun* y *Runx2*. Al final, a P8 vemos que, aunque *c-Jun* y *Runx2* se mantienen elevados en los *dKO*, las células de Schwann ya comiencen a normalizar el proceso de mielinización (Figura 15.L). Es interesante que a P2 y P8, *Oct-6* se encuentre elevado mientras que *Krox20*, su diana transcripcional, no lo esté. Experimentos futuros serán necesarios para entender esta observación.

Tal como he indicado anteriormente, las diferentes HDACs de clase IIa son capaces de compensarse genéticamente. Por ello pensamos que tal vez otro de los miembros de esta familia, la HDAC7, que también se expresa en las células de Schwann (Figura 11.B), podía estar sustituyendo a HDAC4 y HDAC5 permitiendo la mielinización, si bien retrasada, en los *dKO*. Para explorar esta hipótesis, generamos un ratón *tKO* para las *HDAC4*, *HDAC5* y *HDAC7*. Tal como hipotetizábamos, en el ratón *tKO* tenemos un fenotipo más robusto que en el *dKO*; el retraso en la transición de la célula de Schwann pro-mielinizante a la mSC es mucho mayor, observándose un déficit robusto en la mielinización axonal en el ratón *tKO* a P2 y P8 (Figuras 16.C y 16.I). Sin embargo, la mielinización parece que se acaba normalizando a P21 (Figura 16.A) (aunque todavía tenemos que aumentar el número de muestras de TEM a P21 para probar rotundamente que el ratón *tKO* acaba alcanzando una mielinización normal) y es completamente normal a P60 (ver UI Figura 27). En estos momentos estamos finalizando un análisis transcriptómico exhaustivo mediante qPCR del estado en el que se encuentran los genes de la mielina en los ratones *tKO* a P2, P8 y P21.

Al igual que ocurría con el *dKO* si bien con más retraso, la mielinización en el triple KO acaba aparentemente normalizándose. Parece existir pues un mecanismo capaz de compensar la ausencia de HDAC4, HDAC5 y HDAC7 y permitir que el proceso de mielinización se consiga completar. Si bien desconocemos cual podría ser este mecanismo, es interesante destacar que mientras que no hemos podido detectar la expresión de la *HDAC9* (Figura 11.B) en el nervio ciático de los ratones silvestres ni *KO5*<sup>(+/+)</sup>, este gen es robustamente expresado en el tKO (Figura 16.J). Especulamos con la idea de que en condiciones normales HDAC9 no se expresa en las células de Schwann porque el resto de HDACs de clase IIa bloquean su expresión a través de unirse a Mef2 en el promotor de *HDAC9* (Haberland et al., 2007). La eliminación de estas desreprime su expresión y permite así la activación de un mecanismo de rescate genético que garantiza la mielinización del SNP. En apoyo a esta idea, hemos encontrado que la HDAC4 se une al promotor de la HDAC9 en las células de Schwann (Figura 16.K). En la actualidad nos encontramos realizando experimentos para averiguar si HDAC5 y HDAC7 están también localizadas en el promotor de HDAC9.

Es bien sabido que las células de Schwann presentan una alta capacidad de remielinización después de producirse una lesión. Tanto en el caso de la mielinización durante el desarrollo postembrionario como en la remielinización, se activan los mecanismos moleculares que acaban produciendo la generación de la mielina. Lo primero que debe ocurrir es el silenciamiento de los reguladores negativos de la mielinización (*c-Jun*, *Notch*, *Sox2* y *Pax3*) que se están expresando en las células de Schwann inmaduras y las células de Schwann de reparación. Esto permite que *Sox10* induzca la expresión de *Oct6*, y ambos juntos provocan la activación de la expresión de *Krox20*, quien activa el programa genético de la mielinización (Sock and Wegner, 2019). En ambos casos el mecanismo de señalización celular que activa toda la cascada de cambios es el cAMP producido por el Gpr126 (Mogha et al., 2013; Monk et al., 2009; Monk et al., 2011). Hay que destacar que en el caso de las células de Schwann de reparación se activa la expresión de *Olig1*, cuyo papel en la reparación y la remielinización del SNP todavía es desconocido (Sock and Wegner, 2019). Pese a sus similitudes, existen diferencias entre la mielinización y la remielinización que todavía no han sido comprendidas en su totalidad, como el hecho de que la vaina de mielina de los axones remielinizados sea de menor grosor, (Schroder, 1972), y su distancia internodal se encuentre reducida (Gomez-Sanchez et al., 2017).

Otra de mis metas ha sido averiguar si las HDACs de la clase IIa participan en la remielinización que ocurre durante la regeneración del SNP después de la lesión. En primer lugar, determinamos que la eliminación de la HDAC4 (en el ratón *cKO\_4*) no afecta a la activación del programa de reparación (Figura 17.M), ni a la regeneración axonal. Tampoco afecta dramáticamente a la remielinización (Figura 17.A), sin embargo, hay que destacar que sí existen algunas pequeñas diferencias en este proceso. Así, 10 días después de la lesión, el nervio ciático del ratón *cKO\_4* presenta una mayor área (Figura 17.B) y tiene un mayor número de axones de >1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro sin mielinizar (Figura 17.K), sorteados (Figura 17.F) y sin sortear en una relación 1:1 con las células de Schwann (Figura 17.E). Esto podría ser consecuencia del incremento de los niveles de *c-Jun* de los nervios de estos ratones (Figura 18.B). Además, a 20 y 30 días después de la lesión se contabiliza un mayor número de células de Schwann en el ratón *cKO\_4* (Figuras 17.I y 17.J), posiblemente

consecuencia de un retraso en el bloqueo del ciclo celular por la ausencia de HDAC4 (Figuras 10.A y 10.B).

La eliminación de la HDAC5 en el ratón *KO\_5* tampoco afecta a la activación del programa de reparación (Figura 19.M), ni al punto final de la regeneración axonal. Curiosamente el grupo de la Dra. Cavalli publicó (con el mismo ratón *HDAC5*<sup>-/-</sup> que trabajamos nosotros) que la eliminación de la HDAC5 de los axones retrasa la regeneración axonal, a 40 horas después de la lesión, (Cho et al., 2013). Nosotros no vemos diferencias en el número total de axones de >1,5 µm de diámetro a los 5 mm de la zona de la lesión a los 10, 20, 30 o 60 días después de la lesión (Figuras 19.G y 19.H), por lo que, si la eliminación de la HDAC5 afecta a la activación y la propagación del cono axónico durante la regeneración, debe de ser de una forma muy aguda y transitoria. La eliminación de HDAC5 tampoco afecta a la remielinización del SNP de manera notable (Figura 19.A) aunque a P60 hay ciertas diferencias de poca magnitud, como son que el área del nervio ciático del ratón *KO\_5* es algo mayor que el del *WT* (Figura 19.B), y que quedan unos pocos axones de >1,5 µm de diámetro sin mielinizar (Figura 19.E).

Al igual que ocurre con las demás, la eliminación de la HDAC7 en el ratón *cKO\_7* no provoca efecto alguno sobre la activación del programa de reparación (Figura 21.M), en la regeneración axonal ni parece tener tampoco efecto alguno en la remielinización del SNP (Figura 21) (aunque todavía tenemos que estudiar mediante TEM como se encuentra el SNP del *cKO\_7* 30 días después de la lesión para confirmarlo con rotundidad).

La eliminación de dos de las cuatro HDACs de la clase IIa en las células de Schwann en el ratón *dKO* provoca una rápida activación de la expresión de *c-Jun* después de producirse la lesión (Figura 23.I) [ver Figuras 8.C, 8.D y Figura Suplementaria S7 del artículo adjunto (Gomis-Coloma et al., 2018)] que no afecta a la activación del programa de reparación, a la degeneración Walleriana, a la regeneración axonal ni al aclaramiento de la mielina (Figuras 23.B y 23.E). Sin embargo, la eliminación de HDAC4 sí provoca un retraso en el bloqueo de la expresión de *c-Jun* (Figuras 25.B) que afecta a la transición de célula de reparación a mSC durante la remielinización (Figura 24.A). Así, 10 días después de la lesión vemos claramente un mayor número de axones con >1,5 µm de diámetro no mielinizados (Figuras 24.E y 24.F) y un menor número de mSC (Figura 24.J) en el ratón *dKO*, lo que nos informa de que hay un retraso en la remielinización (Figuras 24.C y 24.K). A 20 días después de la lesión, y aunque los niveles de *c-Jun* ya se han normalizado (Figura 25.B), vemos como en el *dKO* todavía quedan axones de >1,5 µm de diámetro sin mielinizar (que se mantienen en este estado incluso 30 días después de la lesión) (Figuras 24.E y 24.F). Además, en el *dKO* vemos un mayor número de células de Schwann a 20 días después de la lesión (Figura 24.I).

En los nervios del ratón *tKO* a P60 las células de Schwann mantienen altos los niveles de *c-Jun* (Figuras 28.B y 28.E), debido a la deficiencia en su silenciamiento provocado por la ausencia de las tres HDACs de la clase IIa. Sin embargo estos elevados niveles de *c-Jun* aparentemente no afectan a la expresión de *Krox20* (Figura 28.C). Sin embargo, si detectamos un pequeño déficit en los niveles de *Mpz* (Figuras 28.D y 28.F). La ligera incongruencia entre la expresión *Krox20* y *Mpz* es posible que sea debida a que los niveles de *Mpz* reflejen mas bien el histórico de la expresión de

Krox20 más que el actual. Este punto está siendo estudiado actualmente en nuestro laboratorio.

En los *tKO* la deficiencia del silenciamiento de *c-Jun* durante el desarrollo provoca la existencia de altos niveles de algunos de los genes característicos de las células de Schwann inmaduras y de reparación, sin que se haya producido una lesión, como *Gdnf* (Figura 26.I), *Olig1* (Figura 26.J) y *p75<sup>NTR</sup>* (Figura 26.M). Además, después de la lesión, las células de Schwann del *tKO* desarrollan una rápida activación de la expresión de *c-Jun* (Figura 26.L), lo que a su vez provoca el rápido incremento de la expresión de los otros genes de reparación y acaba produciendo un adelanto de la degeneración Walleriana y del aclaramiento de la mielina y otros restos del tejido dañado (Figuras 26.B, 26.E y 26.H).

Interesantemente, durante la regeneración del nervio del *tKO* hay un claro retraso en la transición de célula de reparación a la mSC (Figura 27.A). Esto está posiblemente provocado por la incapacidad de las SC de estos ratones para reprimir la expresión de *c-Jun* (Figura 28.H). El mantenimiento de los altos niveles de *c-Jun* bloquea la expresión de *Krox20* (Figura 28.I) y de *Mpz* (Figura 28.J), así como del resto de proteínas de la mielina, lo que finalmente conlleva al retraso en la mielinización del SNP (Figuras 27.C, 27.D, 27.E, 27.F, 27.J y 27.K). Además, la ausencia de tres de las cuatro HDACs de la clase IIa provoca un aumento de la proliferación celular (Figura 27.I) que tiene como consecuencia el aumento del área de los nervios (Figura 27.B). Las diferencias del número total de axones de >1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro cuantificados (Figuras 27.G y 27.H), son posiblemente causadas por la deficiencia en la mielinización, ya que el aumento fisiológico del diámetro de los axones durante el desarrollo postembrionario así como el que se produce durante la regeneración del SNP, está regulado por la mSC (Dashiell et al., 2002; Yin et al., 1998).

Los profesores Rhona Mirsky y Kristján R. Jessen (UCL) demostraron recientemente que el mantenimiento de elevados niveles de *c-Jun* en las células de Schwann durante el desarrollo y la vida adulta, provoca una deficiencia en la activación del programa de mielinización y de remielinización, además de incrementar la proliferación celular (Fazal et al., 2017). Esto apoya la idea de que el retraso en la mielinización y la remielinización que observamos en el *dKO* y el *tKO* esta provocado por la demora en la transición de célula de Schwann de reparación a mielinizante, consecuencia de la desrepresión en la expresión de *c-Jun*.

En resumen, nuestro trabajo demuestra pues, que las HDACs de la clase IIa son mediadores fundamentales de un mecanismo epigenético que, en respuesta al incremento en los niveles de cAMP, asegura el bloqueo del programa transcripcional de las células de Schwann inmaduras (durante el desarrollo) y de reparación (después de la lesión), permitiendo así la activación del programa genético de la mielinización.

### CONCLUSIONES

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

1. El cAMP, a concentraciones pro-diferenciadoras, provoca la traslocación nuclear de la HDAC4 en las células de Schwann, en parte a través de la activación de la PKA.
2. La eliminación de la HDAC4 en las células de Schwann en cultivo bloquea la capacidad diferenciadora del cAMP, perdiéndose su capacidad de bloquear *c-Jun* y de inducir *Krox20*.
3. La HDAC4 dentro del núcleo de la célula de Schwann se une al promotor de *c-Jun* a través de un factor de transcripción (que hasta este momento desconocemos) desde donde recluta a la HDAC3 formando un complejo con NCoR1. Este complejo desacetila a la Histona 3 en la Lisina 9 produciendo un bloqueo en la expresión de *c-Jun*.
4. El bloqueo de la expresión de *c-Jun* por parte de la HDAC4 en las células de Schwann permite la expresión de *Krox20* y la activación del programa genético de la mielinización.
5. La eliminación *in vivo* de la HDAC4 en las células de Schwann provoca un ligero retraso en la mielinización durante desarrollo postembrionario y en la remielinización después de la lesión.
6. La eliminación *in vivo* de la HDAC5 en todas las células del ratón no produce alteraciones en la mielinización durante el desarrollo postembrionario ni en la remielinización después de la lesión.
7. La eliminación *in vivo* de la HDAC7 en las células de Schwann no produce alteraciones en la mielinización durante el desarrollo postembrionario ni en la remielinización después de la lesión.
8. La eliminación de la HDAC4 en un fondo genético *KO* para la HDAC5, provoca un retraso en la mielinización durante el desarrollo postembrionario, mayor que el producido la eliminación de la HDAC4, y un retraso en la remielinización a los 10 días después de producirse el daño. En estos ratones no se ve afectada la cinética de activación de la degeneración Walleriana, ni el aclaramiento de la mielina.
9. La eliminación de la HDAC4 y la HDAC7 en un fondo genético *KO* para la HDAC5, provoca notable retraso en la mielinización durante el desarrollo postembrionario, mayor que el producido en el *dKO*, y un retraso en la remielinización después de la lesión, que se mantiene al menos durante los primeros 30 días después de producirse el daño. Además, en estos ratones se acelera la degeneración Walleriana y el aclaramiento de la mielina.
10. En base a nuestros resultados, proponemos que las HDACs de la clase IIa son las encargadas de traducir la señal del cAMP en las células de Schwann, bloqueando la expresión de *c-Jun* e induciendo la expresión de *Krox20*. Esto provoca la diferenciación de las células de Schwann inmaduras y de reparación a células de Schwann mielinizantes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T., and Karin, M. (1988). The jun Proto-Oncogene Is Positively Autoregulated by Its Product, JunAP-1. *Cell* 55, 875-885.
- Arthur-Farraj, P., Wanek, K., Hantke, J., Davis, C.M., Jayakar, A., Parkinson, D.B., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2011). Mouse schwann cells need both NRG1 and cyclic AMP to myelinate. *Glia* 59, 720-733.
- Arthur-Farraj, P.J., Latouche, M., Wilton, D.K., Quintes, S., Chabrol, E., Banerjee, A., Woodhoo, A., Jenkins, B., Rahman, M., Turmaine, M., et al. (2012). c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron* 75, 633-647.
- Arthur-Farraj, P.J., Morgan, C.C., Adamowicz, M., Gomez-Sanchez, J.A., Fazal, S.V., Beucher, A., Razzaghi, B., Mirsky, R., Jessen, K.R., and Aitman, T.J. (2017). Changes in the Coding and Non-coding Transcriptome and DNA Methylome that Define the Schwann Cell Repair Phenotype after Nerve Injury. *Cell reports* 20, 2719-2734.
- Azagra, A., Roman-Gonzalez, L., Collazo, O., Rodriguez-Ubreva, J., de Yébenes, V.G., Bareda-Zahonero, B., Rodriguez, J., Castro de Moura, M., Grego-Bessa, J., Fernandez-Duran, I., et al. (2016). In vivo conditional deletion of HDAC7 reveals its requirement to establish proper B lymphocyte identity and development. *The Journal of experimental medicine* 213, 2591-2601.
- Bacallao, K., and Monje, P.V. (2013). Opposing roles of PKA and EPAC in the cAMP-dependent regulation of schwann cell proliferation and differentiation [corrected]. *PloS one* 8, e82354.
- Backs, J., Worst, B.C., Lehmann, L.H., Patrick, D.M., Jebessa, Z., Kreusser, M.M., Sun, Q., Chen, L., Heft, C., Katus, H.A., et al. (2011). Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4. *The Journal of cell biology* 195, 403-415.
- Berdeaux, R., Goebel, N., Banaszynski, L., Takemori, H., Wandless, T., Shelton, G.D., and Montminy, M. (2007). SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nature medicine* 13, 597-603.
- Bermingham, J.R., Scherer, S.S., O'Connell, S., Arroyo, S., Kalla, E., Kalla, K.A., Powell, F.L., and Rosenfeld, M.G. (1996). Tst-1 Oct-6 SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. *Genes & development* 10(14), 1751-1762.
- Bottenstein, J.E., and Sato, G.H. (1979). Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(1), 514-517.
- Bradley, E.W., Carpio, L.R., Olson, E.N., and Westendorf, J.J. (2015). Histone deacetylase 7 (Hdac7) suppresses chondrocyte proliferation and beta-catenin activity during endochondral ossification. *The Journal of biological chemistry* 290, 118-126.
- Brugger, V., Duman, M., Bochud, M., Munger, E., Heller, M., Ruff, S., and Jacob, C. (2017). Delaying histone deacetylase response to injury accelerates conversion into repair Schwann cells and nerve regeneration. *Nature communications* 8, 14272.
- Burnett, M.G., and Zager, E.L. (2004). Pathophysiology of peripheral nerve injury a brief review. *Neurosurg Focus* 16, pE1.
- Chang, S., McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Richardson, J.A., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2004). Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Molecular and cellular biology* 24, 8467-8476.
- Chang, S., Young, B.D., Li, S., Qi, X., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2006). Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell* 126, 321-334.
- Chen, Y., Wang, H., Yoon, S.O., Xu, X., Hottiger, M.O., Svaren, J., Nave, K.A., Kim, H.A., Olson, E.N., and Lu, Q.R. (2011). HDAC-mediated deacetylation of NF-kappaB is critical for Schwann cell myelination. *Nature neuroscience* 14, 437-441.
- Cho, Y., Sloutsky, R., Naegle, K.M., and Cavalli, V. (2013). Injury-induced HDAC5 nuclear export is essential for axon regeneration. *Cell* 155, 894-908.
- Dashiell, S.M., Tanner, S.L., Pant, H.C., and Quarles, R.H. (2002). Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases. *Journal of Neurochemistry* 81, 1263-1272.

- Decker, L., Desmarquet-Trin-Dinh, C., Taillebourg, E., Ghislain, J., Vallat, J.M., and Charnay, P. (2006). Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 9771-9779.
- Ding, D., Zhang, P., Liu, Y., Wang, Y., Sun, W., Yu, Z., Cheng, Z., and Wang, Y. (2018). Runx2 was Correlated with Neurite Outgrowth and Schwann Cell Differentiation, Migration After Sciatic Nerve Crush. *Neurochemical research* 43, 2423-2434.
- Duman, M., Martinez-Moreno, M., Jacob, C., and Tapinos, N. (2020). Functions of histone modifications and histone modifiers in Schwann cells. *Glia*.
- Dun, X.P., Carr, L., Woodley, P.K., Barry, R.W., Drake, L.K., Mindos, T., Roberts, S.L., Lloyd, A.C., and Parkinson, D.B. (2019). Macrophage-Derived Slit3 Controls Cell Migration and Axon Pathfinding in the Peripheral Nerve Bridge. *Cell reports* 26, 1458-1472 e1454.
- Emiliani, S., Fischle, W., Van Lint, C., Al-Abed, Y., and Verdin, E. (1998). Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Biochemistry* 95, 2795–2800.
- Fazal, S.V., Gomez-Sanchez, J.A., Wagstaff, L.J., Musner, N., Otto, G., Janz, M., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2017). Graded Elevation of c-Jun in Schwann Cells In Vivo: Gene Dosage Determines Effects on Development, Remyelination, Tumorigenesis, and Hypomyelination. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 37, 12297-12313.
- Feltri, M.L., D'Antonio, M., Previtali, S., Fasolini, M., Meesing, A., and Wrabetz, L. (1999). P0-Cre transgenic mice for inactivation of adhesion molecules in Schwann cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 883, 116-123.
- Feltri, M.L., Poitelon, Y., and Previtali, S.C. (2016). How Schwann Cells Sort Axons: New Concepts. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 22, 252-265.
- Fischer, L., Dequiedt, F., Hendzel, M.J., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Voelter, W., and Verdin, E. (2002). Enzymatic Activity Associated with Class II HDACs Is Dependent on a Multiprotein Complex Containing HDAC3 and SMRT N-CoR. *Molecular Cell* 9, 45–57.
- Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M.J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W., and Verdin, E. (1999). A New Family of Human Histone Deacetylases Related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *The Journal of biological chemistry* 274(17), 11713-11720.
- Fisher, D.E. (2002). Enzymatic Activity Associated with Class II HDACs Is Dependent on a Multiprotein Complex Containing HDAC3 and SMRT N-CoR.
- Fontana, X., Hristova, M., Da Costa, C., Patodia, S., Thei, L., Makwana, M., Spencer-Dene, B., Latouche, M., Mirsky, R., Jessen, K.R., et al. (2012). c-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. *The Journal of cell biology* 198, 127-141.
- Garbay, B., Heape, A.M., Sargueil, F., and Cassagne, C. (2000). Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progress in neurobiology* 61, 267-304.
- Garratt, A.N., Voiculescu, O., Topilko, P., Charnay, P., and Birchmeier, C. (2000). A Dual Role of erbB2 in Myelination and in Expansion of the Schwann Cell Precursor Pool. *Journal of Cell Biology* 148, 1035–1046.
- Glenn, T.D., and Talbot, W.S. (2013a). Analysis of Gpr126 function defines distinct mechanisms controlling the initiation and maturation of myelin. *Development* 140, 3167-3175.
- Glenn, T.D., and Talbot, W.S. (2013b). Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. *Curr Opin Neurobiol* 23, 1041-1048.
- Gomez-Sanchez, J.A., Carty, L., Iruarrizaga-Lejarreta, M., Palomo-Irigoyen, M., Varela-Rey, M., Griffith, M., Hantke, J., Macias-Camara, N., Azkargorta, M., Aurekoetxea, I., et al. (2015). Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *The Journal of cell biology* 210, 153-168.
- Gomez-Sanchez, J.A., Pilch, K.S., van der Lans, M., Fazal, S.V., Benito, C., Wagstaff, L.J., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2017). After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 37, 9086-9099.
- Gomis-Coloma, C., Velasco-Aviles, S., Gomez-Sanchez, J.A., Casillas-Bajo, A., Backs, J., and Cabedo, H. (2018). Class IIa histone deacetylases link cAMP signaling to the



- myelin transcriptional program of Schwann cells. *The Journal of cell biology* 217, 1249-1268.
- Gordon, J.W., Pagiatakis, C., Salma, J., Du, M., Andreucci, J.J., Zhao, J., Hou, G., Perry, R.L., Dan, Q., Courtman, D., et al. (2009). Protein kinase A-regulated assembly of a MEF2{middle dot}HDAC4 repressor complex controls c-Jun expression in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 284, 19027-19042.
  - Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2000). Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7835-7840.
  - Guo, L., Lee, A.A., Rizvi, T.A., Ratner, N., and Kirschner, L.S. (2013). The protein kinase A regulatory subunit R1A (Prkar1a) plays critical roles in peripheral nerve development. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 17967-17975.
  - Ha, C.H., Kim, J.Y., Zhao, J., Wang, W., Jhun, B.S., Wong, C., and Jin, Z.G. (2010). PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15467-15472.
  - Haberland, M., Arnold, M.A., McAnally, J., Phan, D., Kim, Y., and Olson, E.N. (2007). Regulation of HDAC9 gene expression by MEF2 establishes a negative-feedback loop in the transcriptional circuitry of muscle differentiation. *Molecular and cellular biology* 27, 518-525.
  - Haberland, M., Montgomery, R.L., and Olson, E.N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature reviews Genetics* 10, 32-42.
  - Hai, M., Muja, N., DeVries, G.H., Quarles, R.H., and Patel, P.I. (2002). Comparative analysis of Schwann cell lines as model systems for myelin gene transcription studies. *Journal of neuroscience research* 69, 497-508.
  - Han, A., He, J., Wu, Y., Liu, J.O., and Chen, L. (2005). Mechanism of recruitment of class II histone deacetylases by myocyte enhancer factor-2. *Journal of molecular biology* 345, 91-102.
  - Hancock, M.L., Nowakowski, D.W., Role, L.W., Talmage, D.A., and Flanagan, J.G. (2011). Type III neuregulin 1 regulates pathfinding of sensory axons in the developing spinal cord and periphery. *Development* 138, 4887-4898.
  - He, X., Zhang, L., Queme, L.F., Liu, X., Lu, A., Waclaw, R.R., Dong, X., Zhou, W., Kidd, G., Yoon, S.O., et al. (2018). A histone deacetylase 3-dependent pathway delimits peripheral myelin growth and functional regeneration. *Nature medicine* 24, 338-351.
  - Helmstadter, K.G., Erickson, J.R., Dao, K., Bossuyt, J., and Bers, D.M. (2011). Beta-Adrenergic Activation Enhances Histone Deacetylase 4 nuclear Localization via Pka and Counters Camkii-Dependent Effects in Adult Rabbit Cardiac Myocytes. *Biophysical Journal* 100, 80a.
  - Henriksson, E., Sall, J., Gormand, A., Wasserstrom, S., Morrice, N.A., Fritzen, A.M., Foretz, M., Campbell, D.G., Sakamoto, K., Ekelund, M., et al. (2015). SIK2 regulates CRTCs, HDAC4 and glucose uptake in adipocytes. *Journal of cell science* 128, 472-486.
  - Hung, H.A., Sun, G., Keles, S., and Svaren, J. (2015). Dynamic regulation of Schwann cell enhancers after peripheral nerve injury. *The Journal of biological chemistry* 290, 6937-6950.
  - Jacob, C. (2015). Transcriptional control of neural crest specification into peripheral glia. *Glia* 63, 1883-1896.
  - Jacob, C., Lebrun-Julien, F., and Suter, U. (2011). How histone deacetylases control myelination. *Molecular neurobiology* 44, 303-312.
  - Jacob, C., Lotscher, P., Engler, S., Baggiolini, A., Varum Tavares, S., Brugger, V., John, N., Buchmann-Moller, S., Snider, P.L., Conway, S.J., et al. (2014). HDAC1 and HDAC2 control the specification of neural crest cells into peripheral glia. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 6112-6122.
  - Jaegle, M., Mandemakers, W., Broos, L., Zwart, R., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F., and Meijer, D. (1996). The POU Factor Oct-6 and Schwann Cell Differentiation. *Science* 273(5274), 507-510.
  - Jessen, K.R., and Arthur-Farraj, P. (2019). Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. *Glia* 67, 421-437.

- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature reviews Neuroscience* 6, 671-682.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2008). Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia* 56, 1552-1565.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *The Journal of physiology* 594, 3521-3531.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2019a). Schwann Cell Precursors; Multipotent Glial Cells in Embryonic Nerves. *Frontiers in molecular neuroscience* 12, 69.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2019b). The Success and Failure of the Schwann Cell Response to Nerve Injury. *Frontiers in cellular neuroscience* 13, 33.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., and Arthur-Farraj, P. (2015a). The Role of Cell Plasticity in Tissue Repair: Adaptive Cellular Reprogramming. *Developmental cell* 34, 613-620.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., and Lloyd, A.C. (2015b). Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7, a020487.
- Jones, E.A., Lopez-Anido, C., Srinivasan, R., Krueger, C., Chang, L.W., Nagarajan, R., and Svaren, J. (2011). Regulation of the PMP22 gene through an intronic enhancer. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 4242-4250.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., and Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in Genetics* 16, 182-187.
- Kao, G.D., McKenna, W.G., Guenther, M.G., Muschel, R.J., Lazar, M.A., and Yen, T.J. (2003). Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. *The Journal of cell biology* 160, 1017-1027.
- Kasler, H.G., Young, B.D., Mottet, D., Lim, H.W., Collins, A.M., Olson, E.N., and Verdin, E. (2011). Histone deacetylase 7 regulates cell survival and TCR signaling in CD4/CD8 double-positive thymocytes. *Journal of immunology* 186, 4782-4793.
- Khochbin, S., and Wolffe, A.P. (1997). The Origin and Utility of Histone Deacetylases. *FEBS letters* 419, 157-160.
- Kidd, G.J., Ohno, N., and Trapp, B.D. (2013). Biology of Schwann cells. *Handbook of clinical neurology* 115, 55-79.
- Kim, H.A., Mindos, T., and Parkinson, D.B. (2013). Plastic fantastic: Schwann cells and repair of the peripheral nervous system. *Stem cells translational medicine* 2, 553-557.
- Kursula, P. (2008). Structural properties of proteins specific to the myelin sheath. *Amino acids* 34, 175-185.
- Lahm, A., Paolini, C., Pallaoro, M., Nardi, M.C., Jones, P., Neddermann, P., Sambucini, S., Bottomley, M.J., Lo Surdo, P., Carfi, A., et al. (2007). Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17335-17340.
- Le, N., Nagarajan, R., Wang, J.Y., Araki, T., Schmidt, R.E., and Milbrandt, J. (2005). Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2596-2601.
- LeBlanc, S.E., Jang, S.W., Ward, R.M., Wrabetz, L., and Svaren, J. (2006). Direct regulation of myelin protein zero expression by the Egr2 transactivator. *The Journal of biological chemistry* 281, 5453-5460.
- Limpert, A.S., and Carter, B.D. (2010). Axonal neuregulin 1 type III activates NF-kappaB in Schwann cells during myelin formation. *The Journal of biological chemistry* 285, 16614-16622.
- Liu, Y., and Schneider, M.F. (2013). Opposing HDAC4 nuclear fluxes due to phosphorylation by beta-adrenergic activated protein kinase A or by activity or Epac activated CaMKII in skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology* 591, 3605-3623.
- Lu, G., Zhang, M., Wang, J., Zhang, K., Wu, S., and Zhao, X. (2019). Epigenetic regulation of myelination in health and disease. *The European journal of neuroscience* 49, 1371-1387.
- Lu, J., McKinsey, T.A., Nicol, R.L., and Olson, E.N. (2000). Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4070-4075.
- Mechta-Grigoriou, F., Gerald, D., and Yaniv, M. (2001). The mammalian Jun proteins redundancy and specificity. *Oncogene* 20, 2378 - 2389.

- Michailov, G.V., Sereda, M.W., Brinkmann, B.G., Fischer, T.M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M.H., and Nave, K.A. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304, 700-703.
- Mihaylova, M.M., Vasquez, D.S., Ravnskjaer, K., Denechaud, P.D., Yu, R.T., Alvarez, J.G., Downes, M., Evans, R.M., Montminy, M., and Shaw, R.J. (2011). Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell* 145, 607-621.
- Mirsky, R., and Jessen, K.R. (1996). Schwann cell development, differentiation and myelination. *Current Opinion in Neurobiology* 6, 89-96.
- Mogha, A., Benesh, A.E., Patra, C., Engel, F.B., Schoneberg, T., Liebscher, I., and Monk, K.R. (2013). Gpr126 functions in Schwann cells to control differentiation and myelination via G-protein activation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 17976-17985.
- Mogha, A., D'Rozario, M., and Monk, K.R. (2016). G Protein-Coupled Receptors in Myelinating Glia. *Trends in pharmacological sciences* 37, 977-987.
- Monje, P.V., Rendon, S., Athauda, G., Bates, M., Wood, P.M., and Bunge, M.B. (2009). Non-antagonistic relationship between mitogenic factors and cAMP in adult Schwann cell re-differentiation. *Glia* 57, 947-961.
- Monje, P.V., Soto, J., Bacallao, K., and Wood, P.M. (2010). Schwann cell dedifferentiation is independent of mitogenic signaling and uncoupled to proliferation: role of cAMP and JNK in the maintenance of the differentiated state. *The Journal of biological chemistry* 285, 31024-31036.
- Monk, K.R., Naylor, S.G., Glenn, T.D., Mercurio, S., Perlin, J.R., Dominguez, C., Moens, C.B., and Talbot, W.S. (2009). A G protein-coupled receptor is essential for Schwann cells to initiate myelination. *Science* 325, 1402-1405.
- Monk, K.R., Oshima, K., Jors, S., Heller, S., and Talbot, W.S. (2011). Gpr126 is essential for peripheral nerve development and myelination in mammals. *Development* 138, 2673-2680.
- Morgan, L., Jessen, K.R., and Rhona, M. (1991). The Effects of cAMP on Differentiation of Cultured Schwann Cells Progression from an Early Phenotype (04+) to a Myelin Phenotype (Po ÷, GFAP-, N-CAM-, NGF-Receptor-) Depends on Growth Inhibition. *The Journal of cell biology* 112 (3), 457-467.
- Nishino, T.G., Miyazaki, M., Hoshino, H., Miwa, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2008). 14-3-3 regulates the nuclear import of class IIa histone deacetylases. *Biochemical and biophysical research communications* 377, 852-856.
- Owens, G., Meena, S.K., and Wamhoff, B. (2004a). Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological Reviews* 84, 767-801.
- Owens, G.K., Kumar, M.S., and Wamhoff, B.R. (2004b). Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological Reviews* 84(3), 767-801.
- Paavola, K.J., Sidik, H., Zuchero, J.B., Eckart, M., and Talbot, W.S. (2014). Type IV collagen is an activating ligand for the adhesion G protein-coupled receptor GPR126. *Developmental Neuroscience* 7, ra76.
- Parkinson, D.B., Bhaskaran, A., Arthur-Farraj, P., Noon, L.A., Woodhoo, A., Lloyd, A.C., Feltri, M.L., Wrabetz, L., Behrens, A., Mirsky, R., et al. (2008). c-Jun is a negative regulator of myelination. *The Journal of cell biology* 181, 625-637.
- Parkinson, D.B., Bhaskaran, A., Droggiti, A., Dickinson, S., D'Antonio, M., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2004). Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *The Journal of cell biology* 164, 385-394.
- Parkinson, D.B., Dickinson, S., Bhaskaran, A., Kinsella, M.T., Brophy, P.J., Sherman, D.L., Sharghi-Namini, S., Duran Alonso, M.B., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2003). Regulation of the myelin gene periaxin provides evidence for Krox-20-independent myelin-related signalling in Schwann cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* 23, 13-27.
- Paroni, G., Cernotta, N., Dello Russo, C., Gallinari, P., Pallaoro, M., Foti, C., Talamo, F., Orsatti, L., Steinkuhler, C., and Brancolini, C. (2008). PP2A regulates HDAC4 nuclear import. *Molecular biology of the cell* 19, 655-667.

- Paroni, G., Fontanini, A., Cernotta, N., Foti, C., Gupta, M.P., Yang, X.J., Fasino, D., and Brancolini, C. (2007). Dephosphorylation and caspase processing generate distinct nuclear pools of histone deacetylase 4. *Molecular and cellular biology* 27, 6718-6732.
- Paroni, G., Mizzau, M., Henderson, C., Del Sal, G., Schneider, C., and Brancolini, C. (2004). Caspase-dependent regulation of histone deacetylase 4 nuclear-cytoplasmic shuttling promotes apoptosis. *Molecular biology of the cell* 15, 2804-2818.
- Parra, M. (2015). Class IIa HDACs - new insights into their functions in physiology and pathology. *The FEBS journal* 282, 1736-1744.
- Parra, M., and Verdin, E. (2010). Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases. *Current opinion in pharmacology* 10, 454-460.
- Petersen, S.C., Luo, R., Liebscher, I., Giera, S., Jeong, S.J., Mogha, A., Ghidinelli, M., Feltri, M.L., Schoneberg, T., Piao, X., et al. (2015). The adhesion GPCR GPR126 has distinct, domain-dependent functions in Schwann cell development mediated by interaction with laminin-211. *Neuron* 85, 755-769.
- Pothoff, M.J., Wu, H., Arnold, M.A., Shelton, J.M., Backs, J., McAnally, J., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2007). Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *The Journal of clinical investigation* 117, 2459-2467.
- Remak, R., 1839. Über die Ganglien der Herznerven des Menschen und deren physiologische Bedeutung. *Wchschr. ges. Heilk.* 14, 149–154.
- Roberts, S.L., Dun, X.P., Doddrell, R.D.S., Mindos, T., Drake, L.K., Onaitis, M.W., Florio, F., Quattrini, A., Lloyd, A.C., D'Antonio, M., et al. (2017). Sox2 expression in Schwann cells inhibits myelination in vivo and induces influx of macrophages to the nerve. *Development* 144, 3114-3125.
- Rosenberg, L.H., Cattin, A.L., Fontana, X., Harford-Wright, E., Burden, J.J., White, I.J., Smith, J.G., Napoli, I., Quereda, V., Policarpi, C., et al. (2018). HDAC3 Regulates the Transition to the Homeostatic Myelinating Schwann Cell State. *Cell reports* 25, 2755-2765 e2755.
- Salzer, J.L. (2015). Schwann cell myelination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7, a020529.
- Salzer, J.L., and Zalc, B. (2016). Myelination. *Current biology: CB* 26, R971-R975.
- Schroder, J.M. (1972). Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. *Brain research* 45, 49-65.
- Schweisguth, F. (2004). Regulation of Notch Signaling Activity. *Current Biology* 14, R129-R138.
- Schwer, B., and Verdin, E. (2008). Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell metabolism* 7, 104-112.
- Shimizu, E., Nakatani, T., He, Z., and Partridge, N.C. (2014). Parathyroid hormone regulates histone deacetylase (HDAC) 4 through protein kinase A-mediated phosphorylation and dephosphorylation in osteoblastic cells. *The Journal of biological chemistry* 289, 21340-21350.
- Sobue, G., Shuman, S., and Pleasure, D. (1986). Schwann Cell Responses to Cyclic AMP Proliferation, Change in Shape, and Appearance of Surface Galactocerebroside. *Brain research* 362, 23-32.
- Sock, E., and Wegner, M. (2019). Transcriptional control of myelination and remyelination. *Glia* 67, 2153-2165.
- Stemig, M., Astelford, K., Emery, A., Cho, J.J., Allen, B., Huang, T.H., Gopalakrishnan, R., Mansky, K.C., and Jensen, E.D. (2015). Deletion of histone deacetylase 7 in osteoclasts decreases bone mass in mice by interactions with MITF. *PLoS one* 10, e0123843.
- Svaren, J., and Meijer, D. (2008). The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia* 56, 1541-1551.
- Tammia, M., Mi, R., Sluch, V.M., Zhu, A., Chung, T., Shinn, D., Zack, D.J., Hoke, A., and Mao, H.Q. (2018). Egr2 overexpression in Schwann cells increases myelination frequency in vitro. *Heliyon* 4, e00982.
- Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R.M., Loeb, J.A., Shrager, P., et al. (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47, 681-694.

- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Evercooren, A., Chennoufi, A., Seitanidou, T., Babinet, C., and Charnay, P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371, 796-799.
- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Evercooren, A., Chennoufi, A., Seitanidou, T., Babinet, C., and Charnay, P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371, 796-799.
- Vega, R.B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A.C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J.M., Richardson, J.A., et al. (2004). Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119, 555-566.
- Virchow, R., 1854. Über das ausgebreitete Vorkommen einer dem Nervenmark analogen Substanz in den tierischen Geweben. *Arch. Pathol. Anat. Physiol. klin. Med.* 6, 562–572.
- Walkinshaw, D.R., Weist, R., Kim, G.W., You, L., Xiao, L., Nie, J., Li, C.S., Zhao, S., Xu, M., and Yang, X.J. (2013a). The tumor suppressor kinase LKB1 activates the downstream kinases SIK2 and SIK3 to stimulate nuclear export of class IIa histone deacetylases. *The Journal of biological chemistry* 288, 9345-9362.
- Walkinshaw, D.R., Weist, R., Xiao, L., Yan, K., Kim, G.W., and Yang, X.J. (2013b). Dephosphorylation at a conserved SP motif governs cAMP sensitivity and nuclear localization of class IIa histone deacetylases. *The Journal of biological chemistry* 288, 5591-5605.
- Woodhoo, A., Alonso, M.B., Droggiti, A., Turmaine, M., D'Antonio, M., Parkinson, D.B., Wilton, D.K., Al-Shawi, R., Simons, P., Shen, J., et al. (2009). Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nature neuroscience* 12, 839-847.
- Woodhoo, A., and Sommer, L. (2008). Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia* 56, 1481-1490.
- Wu, L.M., Wang, J., Conidi, A., Zhao, C., Wang, H., Ford, Z., Zhang, L., Zweier, C., Ayee, B.G., Maurel, P., et al. (2016). Zeb2 recruits HDAC-NuRD to inhibit Notch and controls Schwann cell differentiation and remyelination. *Nature neuroscience* 19, 1060-1072.
- Yin, X., Crawford, C.O., Griffin, J.W., Tu, P., Lee, V.M., Li, C., Roder, J., and Trapp, B.D. (1998). Myelin-Associated Glycoprotein Is a Myelin Signal that Modulates the Caliber of Myelinated Axons. *The Journal of Neuroscience* 18(6), :1953–1962.
- Zalc, B. (2016). The acquisition of myelin: An evolutionary perspective. *Brain research* 1641, 4-10.
- Zorick, T.S., Syroid, D.E., Brown, A., Gridley, T., and Lemke, G. (1999). Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells. *Development* 126, 1397-1406.

### AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, he de agradecer al Dr. Hugo Cabedo la oportunidad que me dio de trabajar en su laboratorio, por su continua guía y supervisión en el proyecto. Además, por transmitirme su entusiasmo por la ciencia y la investigación.

En segundo lugar, he de agradecer la infinita paciencia que ha tenido el Dr. Jose Antonio Gomez Sanchez a la hora de ayudarme a adquirir las buenas prácticas de laboratorio y transmitirme su vasto conocimiento. A Nines por su experiencia y esos cafés mañaneros que nos han permitido comenzar el día con buen pie. Y a Niki por todas esas horas que hemos pasado juntos entre pipetas.

Gracias a todas las personas del Instituto de Neurociencias que me han ayudado amablemente en numerosas ocasiones durante esta larga odisea. Y al personal de mantenimiento de las diferentes unidades del Instituto de Neurociencias por su trabajo y apoyo.

Por último, pero no menos importante, a mi familia y amigos, sobretudo al G4 (ellos saben a quien me refiero), por el apoyo constante y aguntar mis verborreas en los momentos de bajón.

Gracias de todo corazón a todos por todo el apoyo y cariño que me habéis transmitido durante todos estos años.

## ANEXO


Artículos anexos a esta tesis doctoral:

“Class IIa histone deacetylases link cAMP signaling to the myelin transcriptional program of Schwann cells”. Clara Gomis-Coloma, Sergio Velasco-Aviles, Jose A. Gomez-Sanchez, Angeles Casillas-Bajo, Johannes Backs y Hugo Cabedo. **Journal of Cell Biology** (2018). <https://doi.org/10.1083/jcb.201611150>.

“Class IIa HDACs in myelination”. Sergio Velasco-Aviles, Jose A. Gomez-Sanchez y Hugo Cabedo. **AGING** (2018). <https://doi.org/10.18632/aging.101443>.

ARTICLE

# Class IIa histone deacetylases link cAMP signaling to the myelin transcriptional program of Schwann cells

Clara Gomis-Coloma<sup>1,2\*</sup> , Sergio Velasco-Aviles<sup>1,2\*</sup>, Jose A. Gomez-Sanchez<sup>1,3\*</sup> , Angeles Casillas-Bajo<sup>1,2</sup>, Johannes Backs<sup>4,5</sup> , and Hugo Cabedo<sup>1,2</sup> 

**Schwann cells respond to cyclic adenosine monophosphate (cAMP) halting proliferation and expressing myelin proteins. Here we show that cAMP signaling induces the nuclear shuttling of the class IIa histone deacetylase (HDAC)-4 in these cells, where it binds to the promoter and blocks the expression of *c-Jun*, a negative regulator of myelination. To do it, HDAC4 does not interfere with the transcriptional activity of MEF2. Instead, by interacting with NCoR1, it recruits HDAC3 and deacetylates histone 3 in the promoter of *c-Jun*, blocking gene expression. Importantly, this is enough to up-regulate *Krox20* and start Schwann cell differentiation program—inducing myelin gene expression. Using conditional knockout mice, we also show that HDAC4 together with HDAC5 redundantly contribute to activate the myelin transcriptional program and the development of myelin sheath in vivo. We propose a model in which cAMP signaling shuttles class IIa HDACs into the nucleus of Schwann cells to regulate the initial steps of myelination in the peripheral nervous system.**

## Introduction

Myelination allows saltatory conduction of action potentials and maintains axon integrity by providing trophic support. During early peripheral nervous system (PNS) development, immature Schwann cells associate with multiple axons but do not form myelin. Later some of these cells will sort large-caliber axons and wrap around them (Jessen and Mirsky, 2005). Signaling molecules on the surface of these axons will induce Schwann cells to differentiate. Interestingly, contact with axons can be overcome in vitro by increasing cAMP levels in Schwann cells (Salzer and Bunge, 1980), suggesting this second messenger has an in vivo role in myelination. Recently it has been shown that the activation of Gpr126 (a G-protein-coupled receptor expressed on the cell surface) increases intracellular cAMP, inducing Schwann cell differentiation and myelin development (Monk et al., 2009, 2011; Mogha et al., 2013; Petersen et al., 2015). cAMP activates protein kinase A (PKA) and the exchange protein directly activated by cAMP (Bacallao and Monje, 2013; Guo et al., 2013; Shen et al., 2014); however, how this induces Schwann cell differentiation and myelin gene expression still remains obscure. Intriguingly, cAMP down-regulates *c-Jun*, a basic leucine zipper domain transcription factor expressed by immature Schwann cells that negatively regulates the expression of the myelin master gene *Krox20* (Monuki et al., 1989; Parkinson et al., 2008). Although *c-Jun*

expression is low in adult nerves, it is strongly reexpressed after injury, enforcing differentiated cells to reprogram into repair Schwann cells, a phenotype that, although different in size and morphology (Gomez-Sanchez et al., 2017), shares the expression of some genes with immature Schwann cells (Arthur-Farraj et al., 2012; Fontana et al., 2012).

Histone deacetylases (HDACs) have crucial roles in development, mainly through their repressive influence on transcription. They are usually classified into four main families: classes I, IIa, IIb, and IV. In addition to these classical HDACs, mammalian genome encodes another group of structurally unrelated deacetylases known as class III HDACs or sirtuins (Haberland et al., 2009). Recently it has been elegantly shown that class I HDACs are pivotal for myelin development and nerve repair (Chen et al., 2011; Jacob et al., 2011a,b, 2014; Brügger et al., 2017). However, little is known about the role of other HDACs in this process. At variance with other members of the family, class IIa HDACs (4, 5, 7, and 9) are expressed in a restricted number of tissues and cell types (Parra, 2015). Also they have no prominent protein-deacetylase activity, as a pivotal tyrosine in the catalytic site is mutated to histidine (Lahm et al., 2007). Thus they cannot directly modulate gene transcription by affecting chromatin condensation. Indeed, class IIa HDACs work mainly as corepressors.

<sup>1</sup>Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández and Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sant Joan, Alicante, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL) and Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Alicante, Spain; <sup>3</sup>Department of Cell and Developmental Biology, University College London, London, England, UK; <sup>4</sup>Department of Molecular Cardiology and Epigenetics, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany; <sup>5</sup>German Center for Cardiovascular Research, Partner Site Heidelberg/Mannheim, Germany.

\*C. Gomis-Coloma, S. Velasco-Aviles, and J.A. Gomez-Sanchez contributed equally to this paper; Correspondence to Hugo Cabedo: [hugo.cabedo@umh.es](mailto:hugo.cabedo@umh.es).

© 2018 Gomis-Coloma et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

Supplemental material can be found at: <http://doi.org/10.1083/jcb.201611150>



Thus, it is known that the N-terminal domain of HDAC4 binds to Mef2-DNA complexes, blocking Mef2-dependent gene expression (Backs et al., 2011). In addition to Mef2, class IIa HDACs bind and regulate the activity of other transcription factors such as Runx2 and CtBP (Vega et al., 2004). Class IIa HDACs are required for the proper development of different tissues. It has been shown that HDAC4 deletion delays Runx2 down-regulation in chondrocytes and provokes premature ossification (Vega et al., 2004). By blocking several promoters critical for muscle differentiation, class IIa HDACs also control myogenesis (McKinsey et al., 2000). Biological activity of this family of proteins is mainly regulated by shuttling between the nucleus and cytoplasm. Phosphorylation of three conserved serines (Ser246, Ser467, and Ser632 in the human sequence) mediates its binding to the chaperone 14-3-3 protein and interferes with a nuclear importation sequence, promoting sequestration in the cytoplasm (McKinsey et al., 2000; Backs et al., 2006; Walkinshaw et al., 2013). cAMP-dependent PKA signaling has the opposite effect by indirectly interfering with serine phosphorylation, which blocks nuclear exportation (Walkinshaw et al., 2013). PKA also directly phosphorylates serine 265/266, hampering its binding to 14-3-3 (Ha et al., 2010; Liu and Schneider, 2013). Interestingly, it has been recently shown that the cAMP-induced nuclear shuttling of HDAC4 in vascular smooth muscle cells (VSMCs) represses *c-Jun* expression by a Mef2-dependent mechanism (Gordon et al., 2009).

Here we explore the possibility that class IIa HDACs mediate cAMP signaling and the establishment of the myelinating phenotype of Schwann cells. First we demonstrate that HDAC4 responds to cAMP by shuttling into the nucleus of Schwann cells. Second, we show that the down-regulation of HDAC4 (with shRNAi) interferes with the capacity of cAMP to down-regulate *c-Jun* and induce differentiation markers such as *Krox20* and *Periaxin*. Importantly, we show that the expression of a constitutively active form of HDAC4 (HDAC4 3SA) is sufficient to block *c-Jun* expression. Our data show that once in the nucleus, HDAC4 recruits the complex NCoR1/HDAC3 and deacetylates histone 3 on the promoter of *c-Jun* to repress the expression of this gene. Strikingly, HDAC4 3SA expression is enough to induce Schwann cells to strongly express *Krox20* and enter the myelin gene transcriptional program. Finally, by using Schwann cell-specific conditional knockouts (KOs), we show that class IIa HDAC4 and HDAC5 redundantly contribute to regulate myelin development in vivo.

## Results

### HDAC4 mediates cAMP-dependent repression of *c-Jun* in cultured Schwann cells

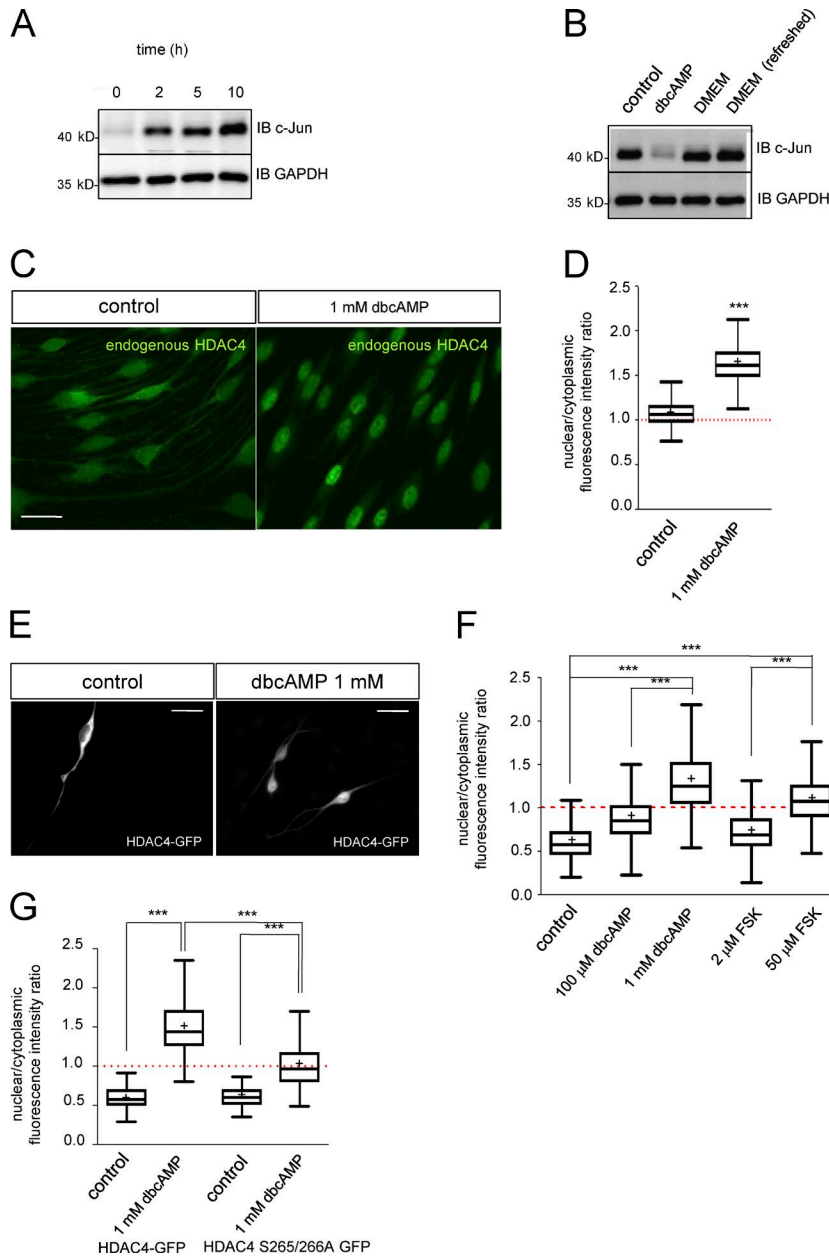
Cultured rat Schwann cells express high levels of *c-Jun* but neither *Krox-20* nor myelin proteins. When exposed to a sustained high concentration of cAMP analogues, they lose the typical bipolar shape and adopt a flat morphology with low *c-Jun* and high *Krox20* and other differentiation markers (Parkinson et al., 2004, 2008; Monje et al., 2009, 2010; Bacallao and Monje, 2013). It has been shown that cAMP produces a drop in *c-Jun* mRNA by Northern blot (Monuki et al., 1989). A similar result was obtained by RT-quantitative PCR (qPCR), suggesting cAMP activates a

signaling pathway that represses the transcription of this gene and decreases protein levels (Fig. S1, A and B). When the cAMP analogue was removed, c-Jun protein was detected as early as 2 h later, reaching a maximum 10 h later (Fig. 1 A). Refreshing the medium every 30 min produced no change in *c-Jun* levels, suggesting that this gene is reexpressed in a cell-autonomous way, in agreement with previous results (Monje et al., 2010; Fig. 1 B). Together these data suggest that cAMP activates and maintains a transcriptional repressive mechanism that blocks *c-Jun* gene expression in Schwann cells.

VSMCs respond to blood vessel injury by expressing *c-Jun* and changing to an “activated phenotype” that contributes to vessel repair (Owens et al., 2004). Interestingly, *c-Jun* up-regulation and the transition to the activated phenotype can be blocked by cAMP. This treatment shuttles HDAC4 into the nucleus and blocks the transcriptional activity of Mef2 on the promoter of *c-Jun* (Gordon et al., 2009). To determine whether a similar mechanism regulates *c-Jun* in Schwann cells, we first examined the expression of these proteins in cultured Schwann cells and in vivo (in mouse sciatic nerves). As shown in Fig. S2 A, HDAC4 and Mef2 are expressed by sciatic nerves and in both proliferating and differentiated cultured rat Schwann cells. In addition, Schwann cells express other members of the class IIa HDAC group, such as HDAC5 and HDAC7. We could not, however, detect the mRNA for HDAC9 (Fig. S2 B). We also explored the expression of these genes in mouse sciatic nerves during postnatal development. Interestingly, mRNA for HDAC4 is highly expressed at P2 and decreases as myelination proceeds. In contrast, HDAC5 and HDAC7 are more stably expressed during this period (Fig. S2, C–E).

We next examined how HDAC4 responds to cAMP signaling in Schwann cells. In control cells, HDAC4 immunoreactivity was found widely distributed in Schwann cells with similar signal intensity in both cytoplasmic and nuclear compartments (nuclear/cytoplasmic ratio [ $r^{n/c}$ ] =  $1.066 \pm 0.004$ ; Fig. 1 C). Interestingly, 1 mM dbcAMP (a concentration high enough to down-regulate *c-Jun* and induce Schwann cell differentiation) dramatically translocated immunoreactivity to the nucleus ( $r^{n/c}$  =  $1.631 \pm 0.008$ ; Fig. 1 B). To obtain further insight, an HDAC4-GFP fusion construct was transfected in Schwann cells. In control conditions (SATO medium), HDAC4-GFP was mainly excluded from the nucleus and retained in the cytoplasm ( $r^{n/c}$  =  $0.623 \pm 0.012$ ; Fig. 1, E and F). When Schwann cells were exposed to 1 mM dbcAMP, HDAC4-GFP shuttled into the nucleus ( $r^{n/c}$  =  $1.347 \pm 0.017$ ), although there was still protein in the cytoplasm (probably because of the high level of protein expression driven by the cytomegalovirus [CMV] promoter). 20  $\mu$ M forskolin (which strongly induces cAMP biosynthesis and induces Schwann differentiation; Arthur-Farraj et al., 2011) produced a similar effect ( $r^{n/c}$  =  $1.117 \pm 0.012$ ). Importantly, concentrations of dbcAMP (100  $\mu$ M) and forskolin (2  $\mu$ M) that do not induce differentiation but have a strong mitogenic effect on Schwann cells were not able to efficiently shuttle HDAC4-GFP into the nucleus ( $r^{n/c}$  =  $0.892 \pm 0.012$  and  $0.722 \pm 0.008$ , respectively; Fig. 1 F).

cAMP activates PKA that can induce HDAC4 shuttling by both direct phosphorylation of Ser265 and Ser266 or by indirect inhibition of Ser246, Ser467, and Ser632 phosphorylation (Ha et al., 2010; Liu and Schneider, 2013; Walkinshaw et al., 2013). To



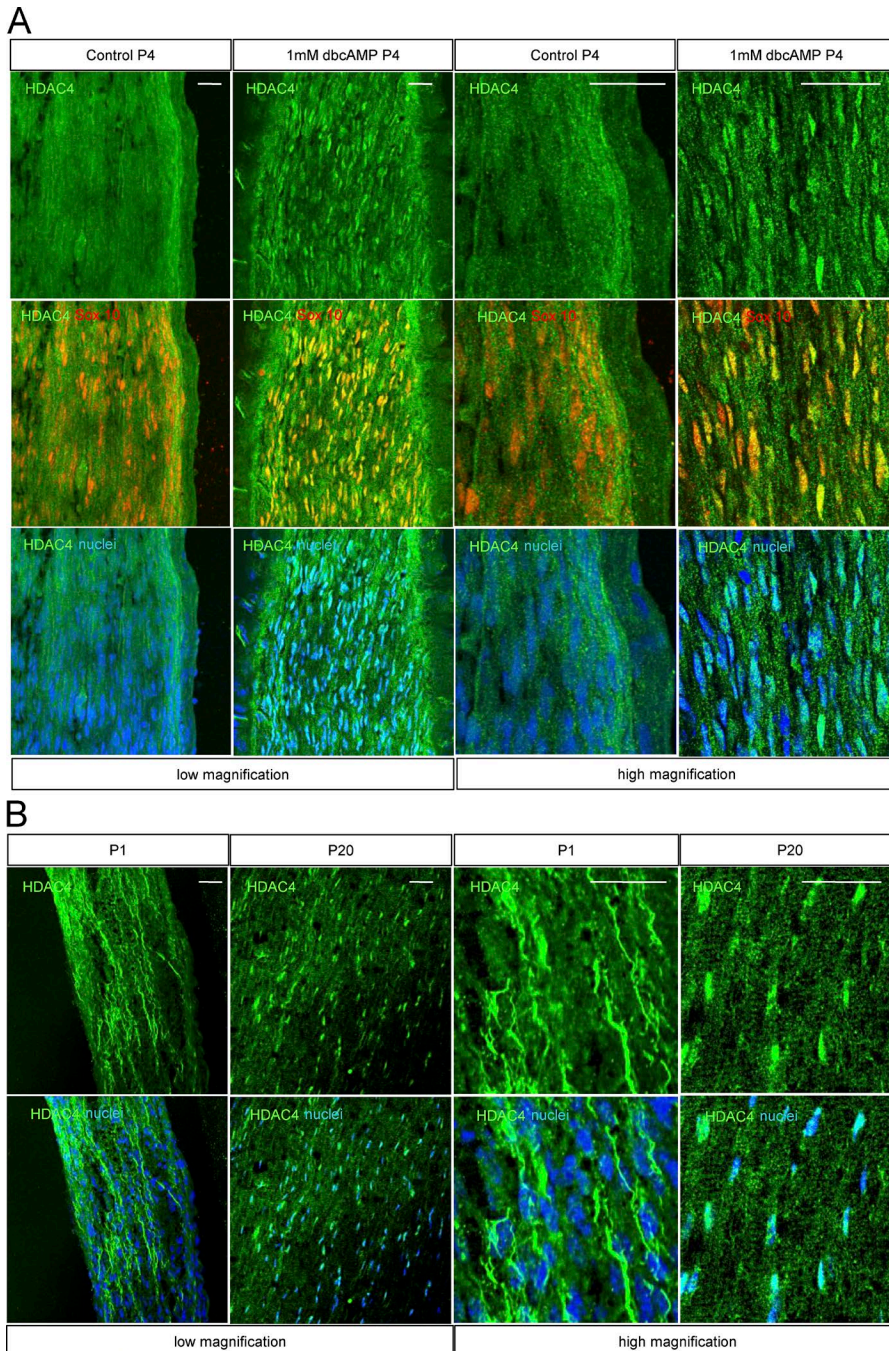
**Figure 1. Strong and sustained cAMP signaling induces nuclear shuttling of HDAC4 in Schwann cells.** (A) Kinetics of *c-Jun* reexpression. Immunoblot (IB) for *c-Jun* from extracts of cultured rat Schwann cells incubated in SATO medium for 2, 5, and 10 h after down-regulation of *c-Jun* by 1 mM dbcAMP. (B) Reexpression of *c-Jun* is cell autonomous. After incubation with 1 mM dbcAMP, Schwann cells were incubated in DMEM for 10 h (DMEM) or for the same period but replacing the DMEM every 30 min (DMEM refreshed). The same amount of protein was loaded in each lane and immunoblotted with anti-*c-Jun*. GAPDH was used as a loading control. (C) cAMP signaling induces shuttling of HDAC4 into the nucleus of Schwann cells. Cultured rat Schwann cells were incubated in SATO medium (control) or in SATO + 1 mM dbcAMP for 24 h, fixed, and submitted to immunofluorescence with anti-HDAC4. (D) A Tukey's box plot of the ratio between the density of fluorescence in the nucleus and the cytoplasm of 900 cells per condition (three different experiments from three different cultures) is shown. Data were analyzed with the unpaired *t* test (two-sided). (E) To better determine HDAC4 response to cAMP signaling, rat Schwann cells were transfected with the HDAC4-GFP construct and incubated for 24 h in SATO medium with the indicated compounds. (F) Only prodifferentiating (but not mitogenic) concentrations of dbcAMP and forskolin (FSK) were able to efficiently induce HDAC4-GFP nuclear shuttling (>1). A Tukey's box plot of the nuclear/cytoplasmic fluorescence intensity ratio for 900 cells per condition of three different experiments is shown. Data were analyzed with the one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test. (G) PKA phosphorylation of Ser265 and Ser266 mediates HDAC4 shuttling in response to cAMP signaling. HDAC4 S265/266A GFP-transfected rat Schwann cells were incubated in SATO medium or SATO + 1 mM dbcAMP for 24 h. Shuttling was determined as before and compared with HDAC4-GFP wild-type transfected cells. As shown, Ser265 and Ser266 elimination partially prevented cAMP-induced nuclear shuttling of HDAC4. Tukey's box plot of the nuclear/cytoplasmic fluorescence intensity ratio for 300 cells per condition of three different experiments is shown. Data were analyzed with the one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test. \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001. Mean is plotted as a "+" Bars, 25 µm.

dissect the contribution of each mechanism, we mutated Ser265 and Ser266 simultaneously to Ala in HDAC4-GFP and explored shuttling in response to cAMP. As shown in Fig. 1 G, this mutant was not very efficiently shuttled in response to cAMP ( $r^{n/c} = 1.012 \pm 0.018$  for the Ser265/266Ala vs.  $1.479 \pm 0.018$  for the wild type), demonstrating a role for direct phosphorylation by PKA in the nuclear translocation of HDAC4 in Schwann cells. However, it still showed a response to cAMP signaling when compared with control ( $r^{n/c} = 0.595 \pm 0.018$  for the Ser265/266Ala in SATO). Together, our data indicate that although the direct phosphorylation of Ser265/266 by PKA regulates the HDAC4 nuclear shuttling in Schwann cells, other indirect mechanisms are also involved.

To check whether cAMP signaling also induces HDAC4 shuttling in vivo, P4 rats were anesthetized, and the sciatic nerve was exposed and covered with a solution of 1 mM dbcAMP in saline. The same experiment was performed with saline

alone as a control. After 1 h of treatment, rats were sacrificed and sciatic nerves extracted and processed for immunolabeling with anti-HDAC4 antibody. As shown in Fig. 2 A, whereas anti-HDAC4 labeling was diffuse, suggesting a predominantly cytoplasmic distribution, cAMP incubation induced a change toward a predominantly nuclear accumulation of HDAC4. Interestingly, HDAC4 shows a predominantly cytoplasmic pattern at P1 (incipient myelination) that changes to a predominantly nuclear distribution in the P20 (advanced myelination) mouse sciatic nerve (Fig. 2 B). Together these data suggest that in vivo also, HDAC4 responds to cAMP signaling by shuttling into the Schwann cell nucleus.

So far our data show that cAMP signaling induces a PKA-mediated shuttling of HDAC4 into the nucleus of Schwann cells. To determine whether this translocation is involved in *c-Jun* down-regulation, we performed loss of function experiments.



**Figure 2. HDAC4 nuclear shuttling in vivo.** **(A)** P4 rat pups were anesthetized, and the sciatic nerve exposed and immersed in a solution of 1 mM dbcAMP in saline for 1 h. A control with saline was also performed. Then nerves were removed fixed and submitted to immunofluorescence with anti-HDAC4 antibody. Schwann cells were identified by Sox10 expression (red). Nuclei were counterstained with Hoechst. Representative confocal images at low and high magnification are shown. **(B)** Distribution pattern of HDAC4 in the sciatic nerve changes during postnatal development. At P1, anti-HDAC4 immunofluorescence is widely distributed, whereas at P20, immunoreactivity has mainly accumulated in the nucleus. P1 and P20 wild-type mice sciatic nerves were fixed and submitted to immunofluorescence with the anti-HDAC4 antibody. Nuclei were counterstained with Hoechst and images obtained with a confocal microscope. Bars, 25  $\mu$ m.

For simplicity, we first used RT4D6 cells, a rat schwannoma-derived cell line that retains many of the properties of Schwann cells (Hai et al., 2002). Interestingly, the shRNAi-mediated block of *HDAC4* expression prevented the ability of dbcAMP to down-regulate *c-Jun* in these cells. In contrast, this transcription factor was efficiently down-regulated in cells transfected with a control shRNAi (shEGFP) and in nontransfected cells (Fig. S3 A). Next, we performed related experiments using cultured rat Schwann cells. We generated lentiviral particles harboring the shRNAi for HDAC4 (lentivirus [Lv] shHDAC4). To identify the infected cells, Lv was engineered to incorporate GFP. A GFP-expressing Lv was used as control (Lv control). Schwann cells were infected and incubated in SATO medium with 1 mM dbcAMP for 24 h. As

shown in Fig. 3 A, the anti-HDAC4 immunofluorescence signal notably decreased in Lv shHDAC4 but not in Lv control infected cells (immunofluorescence intensity =  $73.17 \pm 2.65$  and  $240.80 \pm 4.57$  a.u., respectively; Fig. 3 B). A similar result was obtained by Western blot (Fig. 3 C). Interestingly, whereas anti-*c-Jun* immunoreactivity was  $309.4 \pm 14.29$  a.u. in Lv control-infected Schwann cells, it increased to  $676.4 \pm 37.95$  a.u. in Lv shHDAC4-infected cells (Fig. 3, D and E). A similar result was obtained when *c-Jun* expression was evaluated as the percentage of *c-Jun*-positive cells ( $30.25 \pm 2.53\%$  in control vs.  $63.50 \pm 3.57\%$  in Lv shHDAC4-infected cells; Fig. 3 F) or Western blot (Fig. 3 G). Loss of HDAC4 function prevented not only cAMP-induced *c-Jun* down-regulation but also induction of *Krox20* (immunofluorescence

intensity =  $74.89 \pm 1.89$  a.u. for Lv control-infected cells and  $30.36 \pm 0.78$  a.u. for Lv shHDAC4-infected Schwann cells; Fig. 3, H and I) and *Periaxin* ( $81.29 \pm 2.28$  in control vs.  $42.63 \pm 1.52$  in Lv shHDAC4-infected cells; Fig. 3, J-L).

### HDAC4 binds to the *c-Jun* promoter and down-regulates gene expression by a Mef2-independent mechanism

We next performed HDAC4 gain-of-function experiments. We transfected Schwann cells with a plasmid encoding the HDAC4-GFP fusion protein. 24 h after transfection, cells were incubated in SATO medium for an additional 24 h and fixed for immunolabeling. *c-Jun* expression was quantified as the immunofluorescence intensity in transfected cells (GFP<sup>+</sup>) and expressed as a ratio of *c-Jun* expression in neighboring nontransfected cells (GFP<sup>-</sup>) on the same coverslip. GFP expression by itself produced no significant changes in *c-Jun* levels, validating our approach (ratio =  $0.90 \pm 0.13$ ; Fig. 4 A). In contrast, HDAC4-GFP down-regulated *c-Jun* expression to  $0.47 \pm 0.05$  (Fig. 4 B). However, *c-Jun* was still clearly detected in the nuclei in many of these cells. Because the fusion protein was mainly located in the cytoplasm, we reasoned that there might not be enough HDAC4 protein in the nucleus to achieve complete down-regulation of *c-Jun*. It has been shown that the N-terminal domain of HDAC4 is necessary and sufficient to bind and repress Mef2-dependent transcriptional activity (Arnold et al., 2007), whereas the nuclear exportation signal of HDAC4 is located in the C-terminal end of the protein. Thus we deleted the C-terminal domain to generate the fusion protein HDAC4  $\Delta$ C GFP, which was highly expressed and accumulated as expected in the nucleus (Fig. 4 C). Unexpectedly, *c-Jun* was expressed at similar levels as in the nontransfected or GFP-transfected Schwann cells ( $0.88 \pm 0.09$ ), suggesting that partial down-regulation by HDAC4-GFP (Fig. 4 B) is not mediated by the N-terminal domain, and is therefore Mef2-independent. Therefore, we decided to increase the amount of the full-length protein in the nucleus. We transfected Schwann cells with HDAC4 3SA GFP, a construct with three serine residues (Ser246, Ser467, and Ser632) mutated to a nonphosphorylatable alanine, that cannot be retained efficiently in the cytoplasm (Parra, 2015). Interestingly, the construct dramatically down-regulated *c-Jun* ( $0.22 \pm 0.03$ ) and changed the cell morphology (Fig. 4 D), which looked flatter and lost the typical bipolar shape of cultured Schwann cells. To confirm these results, we infected Schwann cells with adenovirus expressing the HDAC4 3SA tagged with a Flag epitope at the C-terminal domain (Ad HDAC4 3SA Flag) and explored *c-Jun* expression by Western blot. Adenoviral GFP was used as control. As shown in Fig. 4 E, Ad HDAC4 3SA Flag produced notable down-regulation of *c-Jun* in the Western blot. Together our data show that when the full-length HDAC4 is forced to shuttle into the nucleus, Schwann cells down-regulate *c-Jun* and change morphology.

To find out whether HDAC4 3SA Flag blocks *c-Jun* expression by interacting directly with *c-Jun* promoter, we performed chromatin immunoprecipitation assays (ChIPs) coupled to qPCR, with an anti-Flag antibody in Ad HDAC4 3SA Flag and Ad GFP-infected Schwann cells. As shown in Fig. 5 A, the *c-Jun* promoter was pulled down more efficiently from HDAC4 3SA Flag ( $1.72 \pm 0.31\%$  of the input) than from GFP expressing Schwann

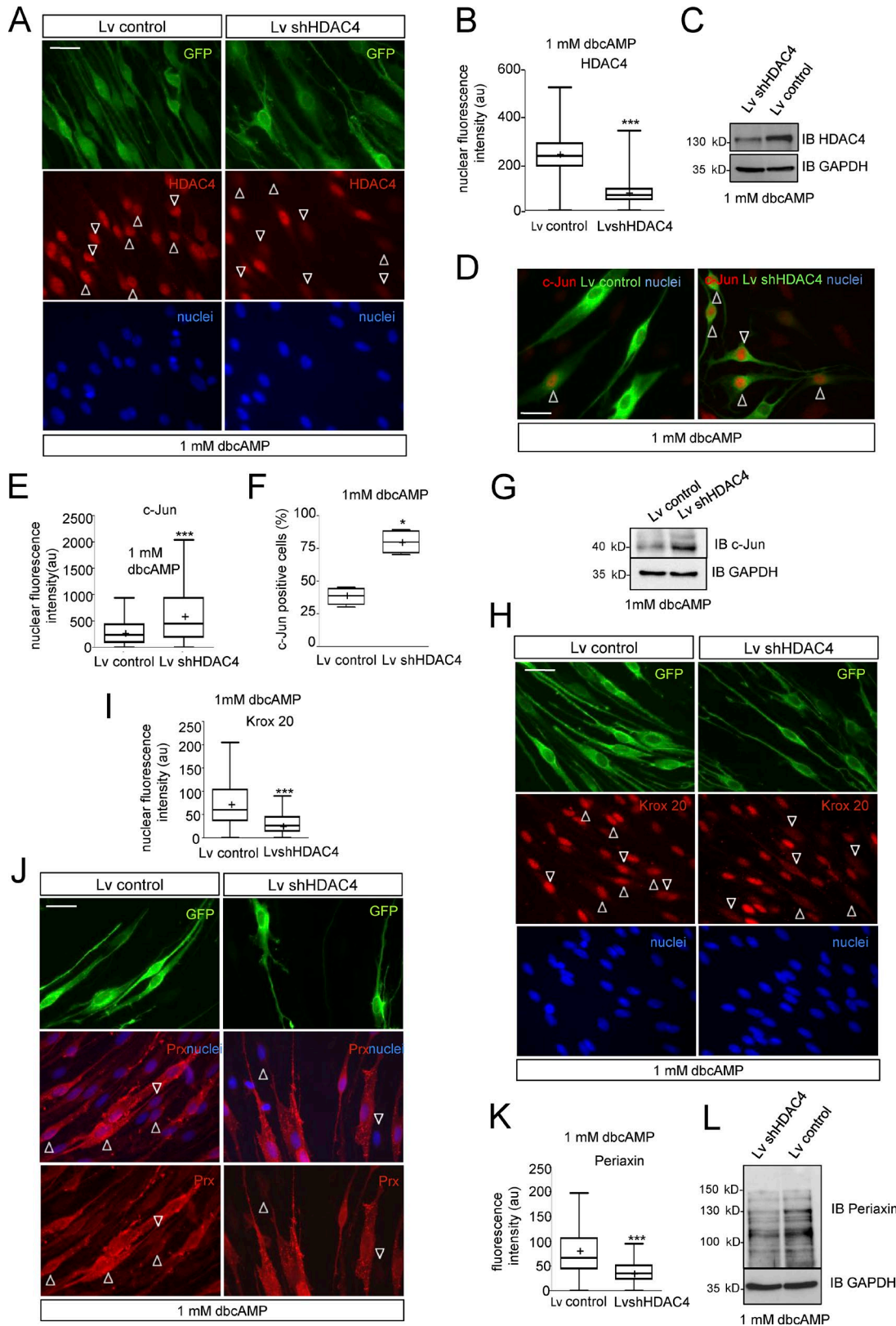
cells ( $0.65 \pm 0.33\%$ ), suggesting interaction of HDAC4 with the promoter region of *c-Jun*. Nonspecific IgG pulled down less promoter in both cases ( $0.30 \pm 0.12$  and  $0.27 \pm 0.10$ , respectively). We then determined the amount of acetylated lysine 9 in histone 3 (a marker of active promoters) on *c-Jun* promoter by ChIP assay. As shown in Fig. 5 B, anti-H3K9Ac pulled down more *c-Jun* promoter from Ad GFP than from Ad HDAC4 3SA Flag-infected Schwann cells.

To confirm these results, we explored whether endogenous HDAC4 also binds to the *c-Jun* promoter. Schwann cells were treated with dbcAMP, cross-linked, and immunoprecipitated with anti-HDAC4, and the amount of recovered *c-Jun* promoter was determined. As shown in Fig. 5 C, anti-HDAC4 antibody pulled down  $9.85 \pm 3.63\%$  of the input, whereas nonspecific IgG pulled down only  $0.60 \pm 0.14\%$ . Together our data show that once in the nucleus, HDAC4 binds to and deacetylates histone 3 on the *c-Jun* promoter to block the expression of this gene in Schwann cells.

Class IIa HDACs do not bind directly DNA but are directed to promoter regions by interaction with transcription factors. Although our data clearly show that the C-terminal domain of the protein enables HDAC4 to down-regulate *c-Jun*, it is still possible that the interaction of HDAC4 with Mef2 might be necessary to locate HDAC4 in the promoter region of *c-Jun*. To answer this question, we mutated the N-terminal domain of HDAC4 to impair its interaction with the Mef2-DNA complex in the *c-Jun* promoter (Han et al., 2005). We generated two distinct constructs, HDAC4 3SA L175A GFP and HDAC4 3SA V179A GFP. To check whether these point mutations indeed block interaction of HDAC4 and Mef2, we transfected the Schwannoma cells with these constructs and looked for Mef2 in the anti-GFP immunoprecipitates. As shown in Fig. 5 D, whereas HDAC4 3SA GFP efficiently pulled down Mef2, these mutants failed to do so. Then we evaluated their capacity to down-regulate *c-Jun* in cultured rat Schwann cells. As shown in Fig. 5 (E and F), both mutants efficiently down-regulated *c-Jun* (ratio =  $0.30 \pm 0.03$  and  $0.24 \pm 0.04$ , respectively), suggesting that the binding of HDAC4 to Mef2 in the promoter is not needed to block *c-Jun* expression in Schwann cells. In summary, our data show that in Schwann cells, activated HDAC4 binds to the promoter and blocks *c-Jun* expression by a Mef2-independent mechanism.

### HDAC4 recruits the deacetylase activity of other HDACs to down-regulate *c-Jun*

Our data suggest that the capacity of HDAC4 to down-regulate *c-Jun* in Schwann cells resides in the C-terminal, where the dead deacetylase domain is located (Lahm et al., 2007). Although there is no transcription factor-binding site described in this domain, it has been elegantly demonstrated that it recruits HDAC3 by forming a multiprotein complex with the N-CoR1/SMRT corepressor, and it is possible to introduce point mutations to abrogate the interaction of this domain with NCoR1 and prevent recruitment of HDAC3 (Fischle et al., 2002). To test whether this mechanism could be working in Schwann cells, we first checked whether HDAC4 interacts with NCoR1 and HDAC3 in these cells. NCoR1 and HDAC3 were efficiently pulled down by the anti-Flag antibody from Ad HDAC4 3SA Flag but not from Ad GFP (Fig. 6 A) or



**Figure 3. Loss of HDAC4 function prevents cAMP-induced Schwann cell differentiation.** (A) Cultured rat Schwann cells were infected with a Lv expressing an shRNAi for HDAC4 (Lv shHDAC4), incubated in SATO medium with 1 mM dbcAMP, and submitted to immunofluorescence with anti-HDAC4. Nuclei were counterstained with Hoechst. Infected cells were identified by GFP expression. As shown, the Lv shHDAC4 (but not the empty Lv control) blocks HDAC4 expression (arrowheads). (B) Tukey's box plot of the HDAC4 fluorescence intensity for 300 cells per condition (three different experiments from three different cultures) is included. Data were analyzed with the unpaired *t* test (two-sided). (C) Immunoblot with anti-HDAC4 confirmed the results. (D) Loss of HDAC4

Ad CMV Flag (Fig. S3 B)-infected Schwann cells. To see whether the interaction is required to block *c-Jun* expression in Schwann cells, aspartate 934 was mutated to an asparagine in the HDAC4 3SA GFP fusion protein. We also generated a second construct by mutating histidine 803 to alanine (Fischle et al., 2002). To check if these mutants have lost the capacity to interact with the NCoR1/HDAC3 complex, we transfected HDAC4 3SA D934N GFP and the HDAC4 3SA H803A GFP into the Schwannoma cell line RT4D6 and looked for NCoR1 and HDAC3 in the immunoprecipitates of these fusion proteins. As is shown in Fig. 6 B, both mutations were sufficient to block the interaction with the complex. The constructs were then transfected into cultured rat Schwann cells. As shown in Fig. 6 C, the efficiency of the construct HDAC4 3SA D934N GFP to block *c-Jun* expression was notably (but not totally) hampered when compared with the nonmutated HDAC4 3SA GFP protein (Fig. 6, C and E). A similar result was obtained for HDAC4 3SA H803A GFP (Fig. 6, D and E). Together, our results suggest that HDAC4 down-regulates *c-Jun* by recruiting the deacetylase activity of HDAC3 to the promoter of this gene through the interaction with the NCoR1 complex. To determine if this model is correct, we treated Schwann cells with dbcAMP to down-regulate *c-Jun*, and then inhibited HDAC activity with 2  $\mu\text{M}$  trichostatin A (TSA), a pan-HDAC inhibitor relatively inefficient for class IIa HDACs (in vitro Ki for HDAC4 = 3.36  $\mu\text{M}$  vs. <0.004  $\mu\text{M}$  for class I HDACs such as HDAC1, 2 and 3; and <0.001 for the class IIb HDAC6 and HDAC10; Lobera et al., 2013). 2 h after TSA incubation, *c-Jun* was clearly up-regulated (Fig. 6 F). Up-regulation was even higher after 5 h of treatment, suggesting that the repressive effects of cAMP on *c-Jun* expression depend on the enzymatic activity of a fully active HDAC. In summary, our data suggest that once in the Schwann cell nucleus and close to the promoter, HDAC4 recruits a bona fide HDAC (probably HDAC3) to locally deacetylate histones and block *c-Jun* expression.

### Nuclear shuttling of HDAC4 starts the myelin gene program of Schwann cells

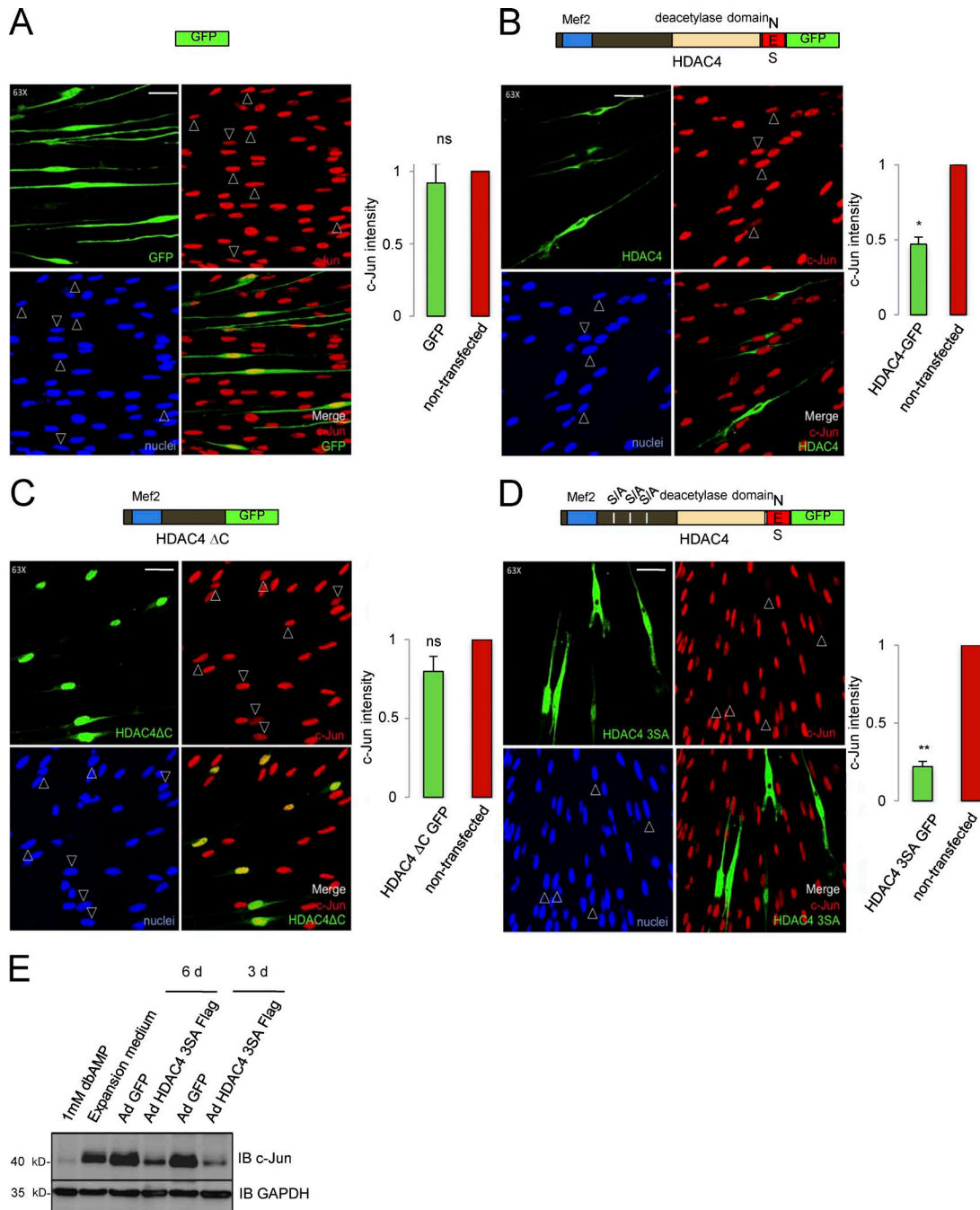
To learn whether the nuclear shuttling of HDAC4 simply blocks *c-Jun* expression or, in contrast, has a wider effect on the phenotype of Schwann cells, we evaluated the cell cycle in Ad HDAC4 3SA Flag-infected cells by using Ki-67 immunolabeling (Fig. 7 A). Virtually no Ad HDAC4 3SA Flag-infected Schwann cells expressed Ki-67 (0.8  $\pm$  0.2%), whereas a considerable fraction of Ad GFP-infected cells did so (16.6  $\pm$  2.5%), suggesting that HDAC4 takes Schwann cells out of cell cycle (Fig. 7 B). As mentioned above we also noticed that HDAC4 3SA expression produces a

strong effect on Schwann cell morphology. Whereas cultured rat Schwann cells adopt the typical bipolar morphology, those cells expressing HDAC4 3SA assumed a flatter morphology, lost their bipolar shape, and showed an enlarged nucleus reminiscent of the changes observed in cAMP-differentiated Schwann cells (Monje et al., 2009; Fig. 7 C). To substantiate these changes, we quantified the nuclear area of Ad HDAC4 3SA Flag-infected Schwann cells and compared it with the control Ad GFP-infected ones. As is shown, the nuclear area increased from 112.4  $\pm$  17  $\mu\text{m}^2$  in control cells to 187.0  $\pm$  2.0  $\mu\text{m}^2$  in the Ad HDAC4 3SA Flag-infected Schwann cells, confirming the observed morphological change (Fig. 7 D).

*c-Jun* prevents Schwann cell differentiation in vitro by blocking the expression of *Krox20*, a master gene that controls the myelin transcriptional program (Parkinson et al., 2008). To learn if HDAC4 nuclear shuttling and *c-Jun* down-regulation are enough to start the Schwann cell myelin gene expression program, we examined the expression of *Krox20* by immunofluorescence. As is shown in Fig. 7 E, Ad HDAC4 3SA Flag robustly induced *Krox20* expression, whereas no expression could be detected in Ad GFP-infected cells. *Periaxin* (an early marker of Schwann cell differentiation) was also induced by HDAC4 3SA Flag (Fig. S4, A and B).

To have a more complete insight into the phenotypic changes induced by HDAC4 3SA, we measured the mRNA of several negative and positive regulators of myelination. First, we confirmed the down-regulation of *c-Jun* mRNA (38  $\pm$  12% of the control in the Ad HDAC4 3SA Flag-infected cells; Fig. 7 F). It has been shown that *Gdnf* and *Artemin*, two pivotal PNS injury-induced genes, are direct *c-Jun* targets (Fontana et al., 2012). Interestingly, we found that nuclear HDAC4 3SA Flag efficiently blocked the mRNA expression of *Gdnf* (31  $\pm$  6%) and *Artemin* (47  $\pm$  5%). In vivo expression of *Olig1* is also controlled by *c-Jun* (Arthur-Farraj et al., 2012). We found that *Olig1* is highly expressed by cultured rat Schwann cells and, interestingly, dramatically down-regulated by HDAC4 3SA Flag (5  $\pm$  1%). It was recently suggested that *Runx2* is another injury-induced gene controlled by *c-Jun* (Hung et al., 2015). Importantly, *Runx2* is also a well-known direct target for HDAC4 in chondrocytes. We observed that cultured Schwann cells abundantly express *Runx2* mRNA, which is blocked by expression of HDAC4 3SA Flag (40  $\pm$  12%; Fig. 7 D). Thus, our data show that the nuclear shuttling of HDAC4 down-regulates several *c-Jun* targets in Schwann cells. Next we looked at positive regulators of myelination and myelin protein genes. First we confirmed *Krox20* mRNA induction by HDAC4 3SA Flag (815  $\pm$  102%

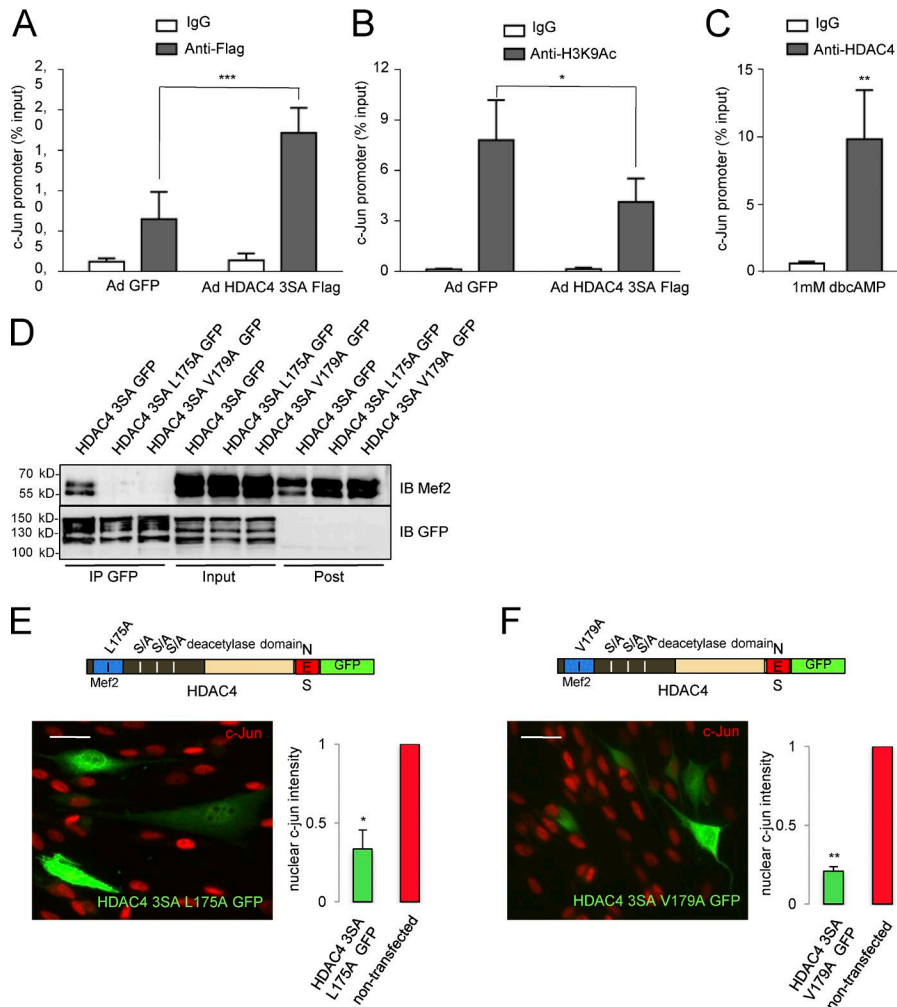
prevents cAMP-mediated *c-Jun* down-regulation. Whereas most of the Lv shHDAC4-infected cells retained *c-Jun* expression after 24 h of 1 mM dbcAMP treatment, most of the Lv control-infected ones were *c-Jun* negative. (E) A Tukey's box plot of the nuclear *c-Jun* fluorescence intensity for 450 cells per condition from four different experiments is shown. Data were analyzed with the unpaired *t* test (two-sided). (F) We also show a Tukey's box plot of counts of *c-Jun*-positive cells expressed as a percentage of the total. These data were analyzed with the Mann-Whitney *U* test. (G) Finally, the immunoblot with anti-*c-Jun* confirmed the results. GAPDH was used as a loading control. (H) Loss of HDAC4 prevents *Krox20* induction. Schwann cells were infected and incubated as described in A. As is shown, Lv shHDAC4-infected Schwann cells (arrowheads) lost the capacity to induce *Krox20* in response to cAMP, whereas the Lv control-infected ones did not. (I) A Tukey's box plot of the nuclear *Krox20* fluorescence intensity for 900 cells per condition, from three different experiments, is shown. Data were analyzed with the unpaired *t* test (two-sided). (J) *Periaxin* expression was also impaired in these cells. (K) A Tukey's box plot of the *Periaxin* cytoplasmic fluorescence intensity for 600 cells per condition, from three different experiments, is shown. Data were analyzed with the unpaired *t* test (two-sided). (L) Immunoblot with anti-*Periaxin* confirmed the results. GAPDH was used as a loading control. \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001. Mean is plotted as a "+." Bars, 25  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4. Gain of HDAC4 function down-regulates *c-Jun*.** (A) Control experiment: the enforced expression of GFP in Schwann cells produced no significant changes in the endogenous *c-Jun* expression. (B) *c-Jun* is partially down-regulated in HDAC4-GFP-transfected Schwann cells. (C) HDAC4 ΔC-GFP, which retains the Mef2-binding domain, produced no changes in *c-Jun* expression. (D) In contrast, the construct HDAC4 3SA GFP dramatically down-regulated *c-Jun* expression and induced morphological changes in the cells. Cultured rat Schwann cells were transfected and submitted to immunofluorescence with anti-*c-Jun* antibody. Transfected cells were identified by GFP expression (arrowheads). The graph shows the ratio of *c-Jun* fluorescence intensity in transfected relative to nontransfected cells on the same coverslip obtained from 300 cells per condition in three different experiments. Data are given as mean ± SE and analyzed with the *t* test (two-sided). \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001. (E) Cultured rat Schwann cells were infected with Ad HDAC4 3SA Flag or Ad GFP and harvested 3 or 6 d later after 24 h of incubation in SATO medium. Protein extracts were immunoblotted with anti-*c-Jun*. Extracts from noninfected Schwann cells grown in expansion medium or treated during 24 h with 1 mM dbcAMP were also included. GAPDH was used as a loading control. Bars, 25 μm. Mef2, Mef2 binding site; S/A, serine residues mutated to alanine; NES, nuclear exportation signal.

of the control). We also found a dramatic increase in the mRNA for both *Drp2* and *Periaxin*, two early markers of myelination (1,371 ± 497% and 1,977 ± 515%, respectively). We could detect notably increased levels of *Mpz* and *Pmp22* mRNAs (165 ± 17%

and 396 ± 151%) in both myelin structural proteins. Importantly, we also found a clear increase in the expression of the rate-limiting enzyme for cholesterol biosynthesis, *HMG-CoA reductase* (147 ± 14%), a pivotal gene for myelin sheath (MS) development.



**Figure 5. HDAC4 binds to the promoter region of *c-Jun* in a Mef2-independent way and deacetylates lysine 9 of histone 3.** (A) Schwann cells infected with Ad HDAC4 3SA Flag or Ad GFP were cross-linked with PFA. Chromatin was purified and immunoprecipitated with anti-Flag monoclonal antibody or a nonspecific mouse IgG (ChIP grade). qPCR was performed with specific primers for the promoter region of *c-Jun*. As shown, the recovery of the *c-Jun* promoter region in the immunoprecipitate was clearly enhanced in HDAC4 3SA Flag-expressing Schwann cells. Nonsignificant recovery was obtained with the nonspecific IgG. Data from five different experiments are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the paired *t* test (two-sided). (B) In a parallel series of experiments, chromatin was immunoprecipitated with anti-H3K9Ac. Less *c-Jun* promoter was recovered from the HDAC4 3SA Flag-infected cells than from control cells, suggesting that HDAC4 promotes the deacetylation of lysine 9 from histone 3 in the *c-Jun* promoter. Data from five different experiments are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the paired *t* test (two-sided). (C) To confirm these observations, cultured rat Schwann cells were treated with 1 mM dbcAMP for 24 h and cross-linked with PFA. Chromatin was purified and immunoprecipitated with anti-HDAC4 monoclonal antibody or a nonspecific mouse IgG (ChIP grade). As shown, *c-Jun* promoter was recovered with the anti-HDAC4 but not with the nonspecific mouse IgG. Data from five different experiments are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the Mann-Whitney *U* test. (D) Mutating L175A or V179A in the HDAC4 3SA GFP construct blocks interaction with Mef2. We introduced mutations L174A or V179A in the HDAC4 3SA GFP construct and transfected the resultant constructs into the Schwannoma cell line RT4D6. Cell extracts were pulled down with a GFP-trap (Chromotek) and immunoblotted with anti-Mef2. Whereas Mef2 was efficiently pulled down by HDAC4 3SA GFP, it was not found in the HDAC4 3SA L175A GFP or HDAC4 3SA V179A GFP immunoprecipitates. Expression and immunoprecipitation of the transfected constructs were checked by immunoblotting with anti-GFP antibodies. (E) HDAC4 3SA GFP L175A mutant was still able to down-regulate *c-Jun*, suggesting that interaction with Mef2 is dispensable. (F) The same result was obtained with the HDAC4 3SA GFP V179A. The graph shows the ratio of *c-Jun* fluorescence intensity in transfected relative to nontransfected cultured rat Schwann cells of the same coverslip obtained from 300 cells per condition in three different experiments. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the *t* test (two-sided). \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001. Bars, 25  $\mu$ m.

a GFP-trap (Chromotek) and immunoblotted with anti-Mef2. Whereas Mef2 was efficiently pulled down by HDAC4 3SA GFP, it was not found in the HDAC4 3SA L175A GFP or HDAC4 3SA V179A GFP immunoprecipitates. Expression and immunoprecipitation of the transfected constructs were checked by immunoblotting with anti-GFP antibodies. (E) HDAC4 3SA GFP L175A mutant was still able to down-regulate *c-Jun*, suggesting that interaction with Mef2 is dispensable. (F) The same result was obtained with the HDAC4 3SA GFP V179A. The graph shows the ratio of *c-Jun* fluorescence intensity in transfected relative to nontransfected cultured rat Schwann cells of the same coverslip obtained from 300 cells per condition in three different experiments. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the *t* test (two-sided). \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001. Bars, 25  $\mu$ m.

However, we observed only minor changes in *Mbp* (112  $\pm$  4%) and no changes in *Plp* mRNA (108  $\pm$  16%; see Discussion). As expected, no differences were found in the expression of *Sox10* (95  $\pm$  13%; Fig. 7 F). Together our data show that the nuclear shuttling of HDAC4 is sufficient to induce the expression of *Krox20* and start the myelin transcriptional program in Schwann cells.

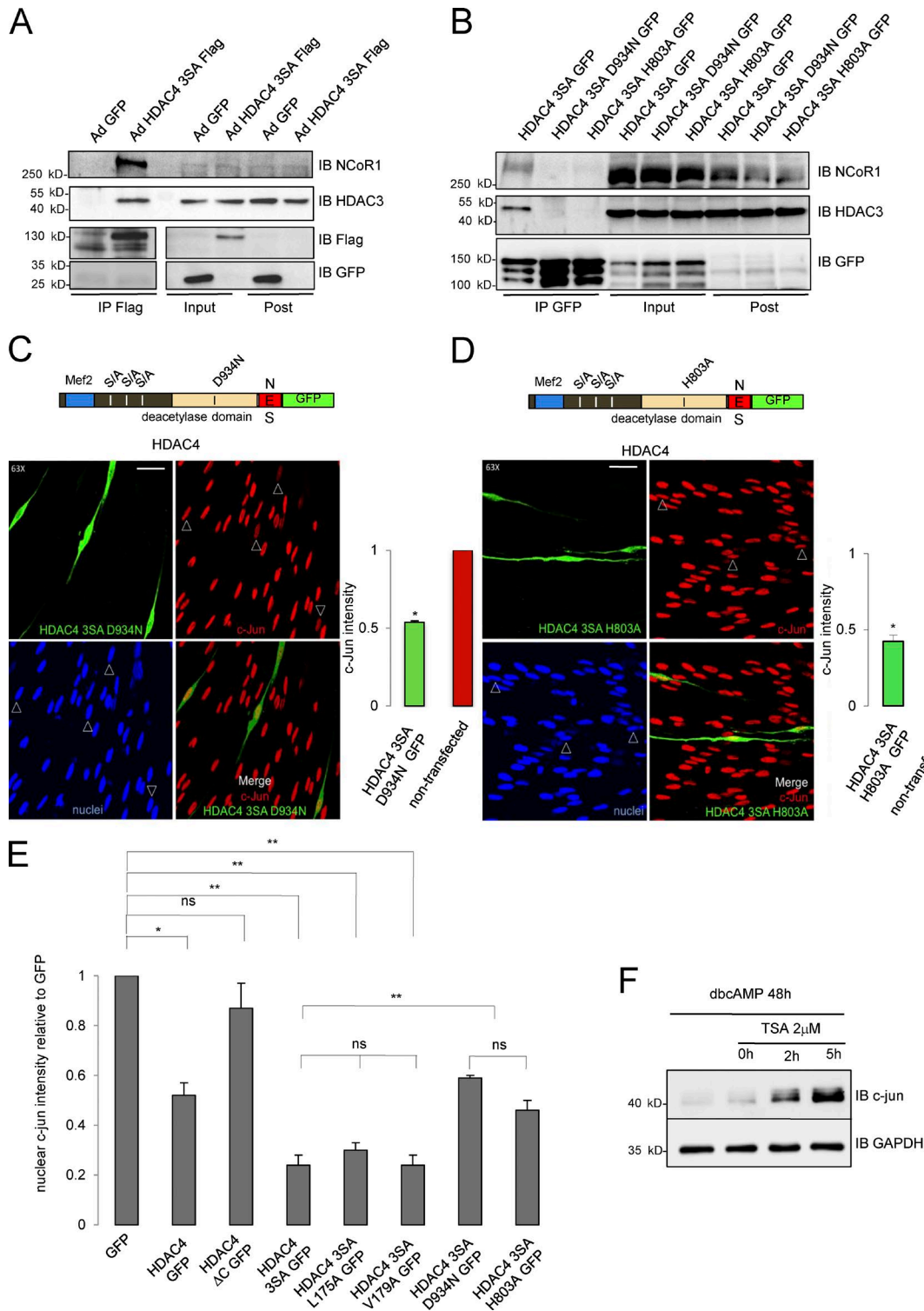
### HDAC4 and HDAC5 contribute to Schwann cell differentiation and myelin development in vivo

We then explored the role of HDAC4 in the differentiation of Schwann cells and myelin development in vivo. Because *HDAC4*<sup>-/-</sup> mice are not viable (Vega et al., 2004), we generated Schwann cell conditional KO mice (*PO-Cre*<sup>+/-</sup>; *HDAC4*<sup>flx/flx</sup>; Figs. S5, A and B) and determined mRNA levels for several negative and positive regulators of myelination in the sciatic nerves of these mice (Fig. S5 C). At postnatal day 0 (P0), *PO-Cre*<sup>+/-</sup>; *HDAC4*<sup>flx/flx</sup> mice showed a tendency (non-statistically significant) to express

more *c-Jun*, and a slight (but statistically significant) decrease in some myelin genes (*Periaxin*, *Mpz*, and *Hmgcr*). At P2, conditional KO mice expressed twice the level of *c-Jun* mRNA (207  $\pm$  11%) as the *PO-Cre*<sup>-/-</sup>; *HDAC4*<sup>flx/flx</sup> littermates. Changes in *Runx2* were not statistically significant. On the other hand, although we found a significant decrease in the expression of *Hmgcr* (68  $\pm$  10%), other myelination markers were not changed (101  $\pm$  7% for *Prx* and 104  $\pm$  10% for *Mpz*). In addition, a slight but statistically significant increase in *Krox 20* mRNA was found (121  $\pm$  6%). At later stages (P5), *c-Jun* mRNA was still high (140  $\pm$  7%) and *Runx2* expression was increased (223  $\pm$  11%), but no decrease in the expression of myelin genes could be detected (113  $\pm$  5% for *Krox20*, 107  $\pm$  3% for *Periaxin*, 119  $\pm$  2% for *Mpz*, and 113  $\pm$  7% for *Hmgcr*; Fig. S5 C).

Although encoded by different genes, all class IIa HDACs share molecular profiles and regulate equivalent genetic programs in other tissues (Parra and Verdin, 2010; Parra, 2015). Thus, it has





**Figure 6. HDAC4 recruits the deacetylase activity from other HDACs through interaction with NcoR1 to down-regulate c-Jun.** (A) HDAC4 interacts with the NCoR1/HDAC3 complex in Schwann cells. Schwann cells were infected with Ad HDAC4 3SA Flag or Ad GFP, lysed, and extracts pulled down with anti-Flag agarose beads. Immunoprecipitates, inputs, and postimmunoprecipitates were immunoblotted with anti-NCoR1 or anti-HDAC3. NCoR1 and HDAC3 were recovered exclusively from Ad HDAC43SA Flag-infected cells. Expression and immunoprecipitation of the introduced proteins was checked by immunoblotting with anti-Flag and anti-GFP antibodies. (B) We introduced mutations D934N or H803A in the HDAC4 3SA GFP construct and transfected the resultant construct into the Schwannoma cell line RT4D6. Cell extracts were pulled down with GFP-trap (Chromotek) and immunoblotted with anti-NCoR1 and anti-HDAC3 antibodies. Whereas NCoR1 and HDAC3 were efficiently pulled down by HDAC4 3SA GFP, none of these proteins were found in the HDAC4 3SA D934N GFP or HDAC4 3SA H803A GFP immunoprecipitates. Expression and immunoprecipitation of the transfected constructs were checked by immunoblotting with anti-GFP antibodies. (C) Blocking the interaction of HDAC4 3SA with the multiprotein complex NcoR1/HDAC3 by the mutation D934N interferes with its capacity to

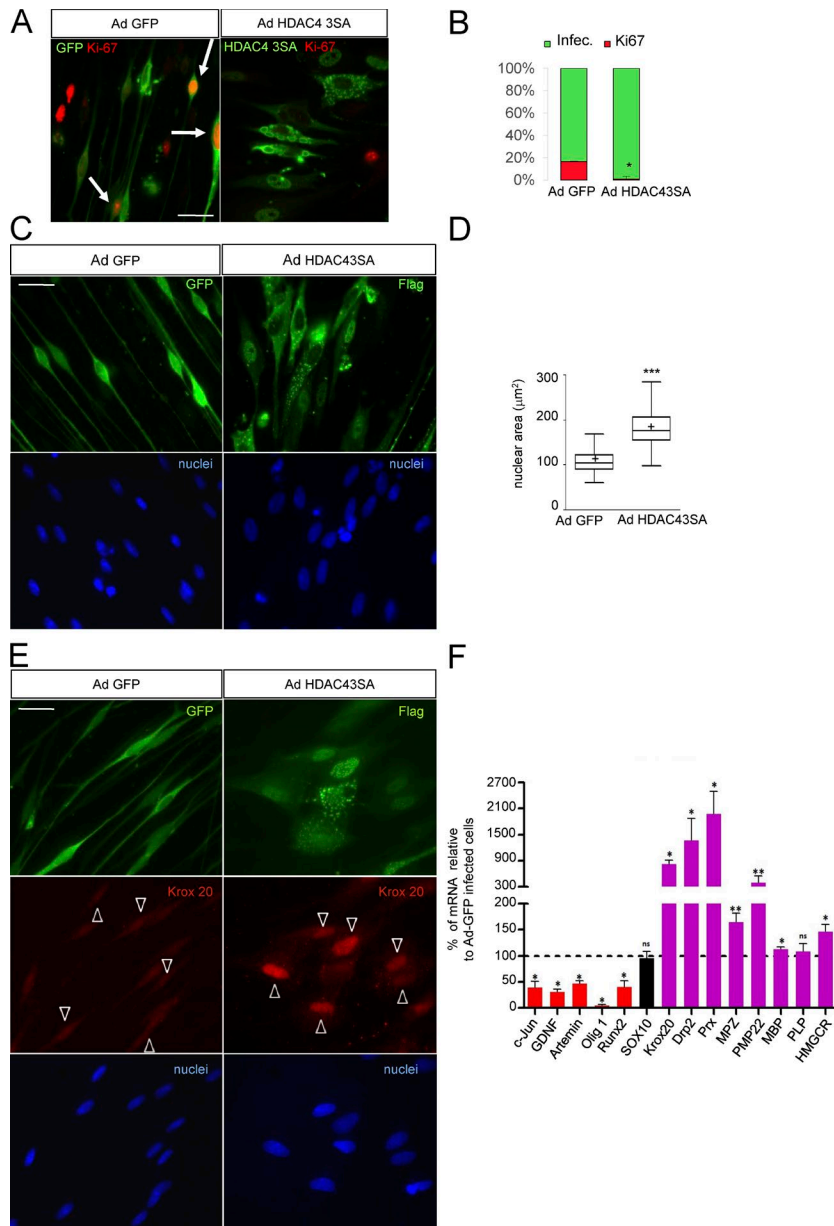
been shown that distinct class IIa HDACs redundantly regulate slow oxidative muscular fiber gene expression. In fact, it is necessary to remove at least four alleles of some of the skeletal muscle expressed class IIa HDACs (4, 5, 7, and 9) to observe a change in the muscle fiber phenotype (Potthoff et al., 2007). To learn whether other class IIa HDACs could compensate for the loss of HDAC4, we generated *HDAC4;HDAC5* Schwann cell double KO mice. Because *HDAC5<sup>-/-</sup>* is viable and has no obvious myelination phenotype, we first explored the myelin gene expression profile in the sciatic nerves of these mice. As shown in Fig. S5 D, no changes in *c-Jun* or *Runx2* expression were found. Expression of myelin genes was not decreased (and even slightly increased in some cases). We then generated *PO-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>* mice, which lack four class IIa HDAC alleles (hereafter called *HDAC4/5 ScKO*) and evaluated myelin gene expression in these nerves. The results were normalized against *PO-Cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>* littermates (hereafter called control). As shown in Fig. 8 A, at P0 we found a slight increase in *c-Jun* mRNA ( $130 \pm 13\%$ ) and in *Runx2* mRNA ( $117 \pm 19\%$ ) in the *HDAC4/5 ScKO*. Interestingly, the mRNA for the master myelination gene *Krox20* was slightly decreased ( $87 \pm 5\%$ ). In agreement with this, mRNAs for myelination markers were significantly down-regulated ( $85 \pm 13\%$  for *Drp2*,  $59 \pm 5\%$  for *Prx*,  $66 \pm 9\%$  for *Pmp22*,  $71 \pm 12\%$  for *Mpz*,  $68 \pm 10\%$  for *Mbp*,  $47 \pm 5\%$  for *Mag*, and  $64 \pm 13\%$  for *Hmgcr*), suggesting a delay in the expression of the myelin gene program in these mice. To substantiate this result, we obtained EM images and quantified MS density. As shown in Fig. 8 B, the number of myelin profiles per nerve area is significantly reduced in the *HDAC4/5 ScKO*, supporting the notion of a delay in myelination in the double KO mice ( $1.47 \pm 0.16$  MS/100  $\mu\text{m}^2$  in the control vs.  $0.18 \pm 0.04$  MS/100  $\mu\text{m}^2$  in the *HDAC4/5 ScKO*). To find out whether this is caused by a delay in the transition between the promyelinating and the myelinating stages, we counted the number of MSs and expressed it as a ratio of the number of segregated axons (both myelinated and in the promyelinating stage [PS]). As shown, this ratio is decreased in *HDAC4/5 ScKO* nerves ( $0.069 \pm 0.008$  in control vs.  $0.008 \pm 0.002$  in *HDAC4/5 ScKO*), suggesting a delay in the transition from the promyelinating stage to the myelin-forming stage rather than a radial sorting defect (Fig. 8 B). We then evaluated gene expression at P2. As shown in Fig. 8 A, *c-Jun* and *Runx2* remained elevated ( $145 \pm 8\%$  and  $131 \pm 12\%$ , respectively). No changes were found in *Krox20* and *Drp2* ( $93 \pm 7\%$  and  $100 \pm 11\%$ , respectively), whereas a significantly decreased expression of other myelin genes was observed ( $67 \pm 4\%$  for *Prx*,  $75 \pm 12\%$  for *Pmp22*,  $65 \pm 1\%$  for *Mpz*,  $75 \pm 6\%$  for *Mbp*,  $79 \pm 9\%$  for *Mag*, and  $68 \pm 6\%$  for *Hmgcr*). Morphologically, myelination was still

delayed ( $8.83 \pm 0.43$  MS/100  $\mu\text{m}^2$  and  $0.47 \pm 0.02$  MS/[MS+PS] for control and  $3.99 \pm 0.26$  MS/100  $\mu\text{m}^2$  and  $0.41 \pm 0.02$  MS/[MS+PS] for *HDAC4/5 ScKO*). When myelination at P8 was evaluated, we found that although *c-Jun* and *Runx2* remained elevated ( $159 \pm 24\%$  and  $290 \pm 20\%$ , respectively) and *Krox20* was slightly decreased, myelin gene expression was not different from that of control littermates. Moreover, morphological parameters of myelin maturation were similar ( $9.88 \pm 0.77$  MS/100  $\mu\text{m}^2$  and  $0.93 \pm 0.01$  MS/[MS+PS] in the controls and  $11.39 \pm 0.36$  MS/100  $\mu\text{m}^2$  and  $0.92 \pm 0.01$  MS/[MS+PS] in the *HDAC4/5 ScKO* nerves; Fig. 8, A and B). A similar result was found for P15 double KO mice (Fig. S6 A). Myelination parameters were also normal in older animals (Fig. S7, B and C), suggesting that other factors (such as other deacetylases) can compensate for the absence of HDAC4 and HDAC5 during MS formation. Interestingly, although *c-Jun* expression and myelination parameters are normal in the adult *HDAC4/5 ScKO*, we observed that after nerve injury, *c-Jun* is reexpressed more efficiently in these mice (Fig. 8, C and D; and Fig. S7), suggesting that HDAC4 and HDAC5 contribute to slow down the up-regulation of *c-Jun* after injury. Together our data suggest that HDAC4 and HDAC5 contribute to the establishment of the myelin transcriptional program and differentiation of Schwann cells in vivo.

## Discussion

During postnatal development, Schwann cells activate the myelin gene expression program to synthesize the lipids and proteins necessary for the development of the MS. Recently it has been elegantly shown that *Gpr126* controls this phenotypic transition in vivo (Monk et al., 2009, 2011; Mogha et al., 2013; Paavola et al., 2014; Petersen et al., 2015). *Gpr126* activation stimulates adenylate cyclase activity and increases the intracellular cAMP concentration, which is necessary for induction of Schwann cell differentiation and myelin membrane development (Monk et al., 2009). Although it has been proposed that rising cAMP in Schwann cells activates both PKA and the exchange protein directly activated by cAMP (Bacallao and Monje, 2013), the precise downstream mechanisms that connect it to the activation of the myelin gene expression program remain largely undefined. Schwann cell myelination is controlled by the tuning of positive regulators such as *Krox20*, *Oct-6*, *Sox10*, and *YY1*, and negative regulators such as *c-Jun*, *Sox2*, *Ednrb*, *Id1*, and *Notch* (Brennan et al., 2000; Jessen et al., 2015a,b). Although some details are still missing, it is clear that *Krox20* expression is necessary and sufficient to induce high levels of myelin gene expression (Parkinson

down-regulate *c-Jun*. Cultured Schwann cells were transfected with this mutant and submitted to immunofluorescence with the *c-Jun* antibody. Transfected cells were identified by GFP expression (arrowheads). The graph shows the ratio of *c-Jun* fluorescence intensity in transfected relative to nontransfected cells of the same coverslip obtained from 300 cells per condition in three different experiments. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the *t* test (two-sided). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (D) A similar result was obtained with the HDAC4 3SA H803A GFP protein. Bars, 25  $\mu\text{m}$ . (E) Summary statistical analysis of the effects of the different mutations introduced in HDAC4 on *c-Jun* expression levels normalized for GFP transfected Schwann cells. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the *t* test (two-sided). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (F) *c-Jun* down-regulation by cAMP depends on a protein with deacetylase activity. Cultured rat Schwann cells were incubated with 1 mM dbcAMP for 48 h to down-regulate *c-Jun*. Then, and still in the presence of dbcAMP, a pan-HDAC inhibitor was added (2  $\mu\text{M}$  TSA). Cells were harvested at different time points and immunoblotted for *c-Jun*. GAPDH was used as a loading control. As shown, inhibition of deacetylase activity reverts the down-regulation of *c-Jun* by dbcAMP.



**Figure 7. HDAC4 gain of function induces Schwann cell differentiation.** (A) HDAC4 3SA blocks Schwann cell proliferation. Schwann cells were infected with Ad HDAC4 3SA Flag or Ad GFP and incubated in SATO medium. 24 h later, cells were fixed and examined by immunofluorescence with anti-Ki67 antibodies. Infected cells were identified with anti-GFP or anti-flag antibodies. Arrows indicate Ki67-positive infected cells. (B) Quantification of more than 600 cells from three different experiments is shown. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the unpaired t test (two-sided). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (C) HDAC4 3SA induces profound morphological changes. Ad GFP-infected Schwann cells show the typical bipolar shape, which changes to an expanded flat epithelial-like morphology with enlarged nucleus in the Ad HDAC4 3SA Flag-infected cells. (D) To substantiate these changes, nuclear area was quantified in 668 cells per condition from three different experiments. A Tukey's box plot of the results is shown. Data were analyzed with the unpaired t test (two-sided). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (E) HDAC4 3SA induces Krox20 expression. Schwann cells were infected with Ad HDAC4 3SA or Ad GFP and incubated in SATO medium. 24 h later, cells were fixed and examined by immunofluorescence with anti-Krox20 antibody. As is shown, only HDAC4 3SA-infected cells expressed Krox20. Arrowheads indicate infected cells. (F) Quantification of mRNA levels expressed typically by nonmyelin-forming (red) and by myelin-forming Schwann cells (magenta) in Ad HDAC4 3SA Flag-infected cells normalized for controls (Ad GFP-infected Schwann cells). *Sox10*, a gene that is expressed by both, is in black. As shown, HDAC4 3SA induces a clear shift toward the myelin gene expression program. As expected, no changes were observed for *Sox10*. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . Bars, 25  $\mu$ m.

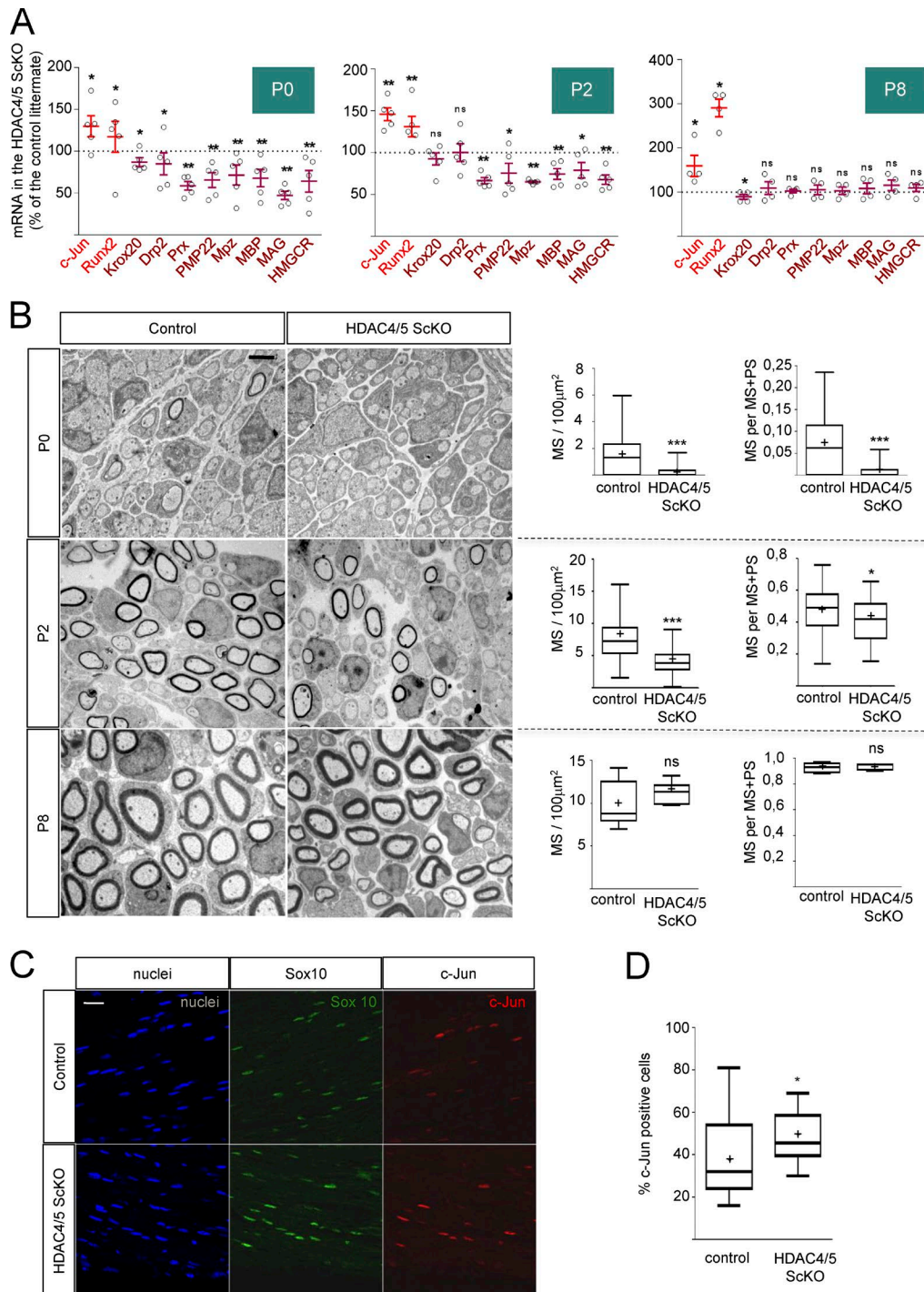
Downloaded from [jcb.rupress.org](http://jcb.rupress.org) on February 23, 2018

et al., 2004). In addition, several “negative regulators” need to be down-regulated to allow Schwann cells to express *Krox20* (Parkinson et al., 2008). Some of these inhibitors (such as *c-Jun*) are promptly reexpressed after nerve injury, when the myelin gene expression program is down-regulated and Schwann cells transdifferentiate into a repair cell that contributes to nerve regeneration (Jessen et al., 2015b). Although repair cells are quite distinct from immature Schwann cells, they share many genetic and biological properties, and can reenter the myelin gene expression program once the relationship with the axons has been reestablished (Jessen et al., 2015a; Benito et al., 2017).

It has been recently shown that the repressor *Zeb2* is essential for Schwann cell differentiation. When *Zeb2* is inactivated, the expression of *Sox2* and *EdnrB* (two potent negative regulators of myelination) is dramatically up-regulated, and Schwann cells cannot express *Krox20* or myelin genes. Thus, the repression of “negative regulators” by *Zeb2* is a necessary step for myelination

(Quintes et al., 2016; Wu et al., 2016). Here we add new evidence suggesting that repression of another “negative regulator” of myelination (*c-Jun*) by class IIa HDACs is also important for myelin development. Our data show that the activation of one of these deacetylases (HDAC4) is sufficient to switch on myelin gene expression. Importantly, the dependence of class IIa HDAC activity on cAMP levels provides a putative link between *Gpr126* signaling and the activation of the myelin transcriptional program by Schwann cells. Although the transcriptional repression of the *c-Jun* promoter can explain many of the effects of HDAC4 in Schwann cells, we found that this protein also binds the promoters of *Runx2* and *Gdnf* (Fig. S8, A and B), suggesting that HDAC4 could contribute to regulate the expression of these genes (and maybe of others repressed in myelinating Schwann cells) through a *c-Jun*-independent mechanism.

It has been known for a long time that the increase of intracellular cAMP levels potentiates the mitogenic effect of some trophic



**Figure 8. HDAC4 and HDAC5 redundantly contribute to Schwann cell differentiation and myelin development in vivo.** (A) Removal of HDAC4 and HDAC5 in Schwann cells delays myelin gene expression. mRNA quantification for markers of nonmyelin- and myelin-forming cells in the PNS. P0 sciatic nerves were removed and total RNA extracted. RT-qPCR with mouse-specific primers for the indicated genes was performed and normalized to 18S rRNA. Graph shows the percentage of mRNA for each gene in the *HDAC4/5 ScKO* (*P0-Cre*<sup>+/-</sup>; *HDAC4*<sup>flx/flx</sup>; *HDAC5*<sup>-/-</sup>) normalized for the control (*P0-Cre*<sup>-/-</sup>; *HDAC4*<sup>flx/flx</sup>; *HDAC5*<sup>-/-</sup>) littermates. At least four mice from four different litters were used per genotype. Data were analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test. A scatter plot is shown with the results obtained in each different experiment, which include also the mean ± SE. (B) Retardation in myelin gene expression is reflected in a delay in myelin development. Transmission EM of P0, P2, and P8 sciatic nerves. Tukey's box plots show the quantification of MS density (MS/100 µm<sup>2</sup>) and the myelination index (ratio of the number of myelin profiles [MS] to the total number of 1:1 segregated axons [MS+PS]). As is shown, whereas both parameters are decreased in the *HDAC4/5 ScKO* at P0 and P2, no differences could be found at P8. For P0, 80 images from four different mice per genotype were quantified; for P2, 78 images from six mice; for P8, 11 images from two different mice per genotype. Data were analyzed with the Mann-Whitney *U* test. Mean is plotted as a "+." \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001. Bar, 2 µm. (C) *c-Jun* is up-regulated faster after nerve injury in the *HDAC4/5 ScKO*. The sciatic nerves of three *HDAC4/5 ScKO* and three control mice were injured and analyzed 16 h later. Transverse cryosections were incubated with the indicated primary antibodies. Imaging was performed on a confocal microscope. Schwann cells were identified as Sox10-positive cells. (D) A Tukey's box plot of the percentage of c-Jun-positive cells. Six images per animal were counted using Image J software. Data were analyzed with the Mann-Whitney *U* test. Mean is plotted as a "+." \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001. Bar, 25 µm.

factors on Schwann cells (Raff et al., 1978; Salzer and Bunge, 1980). Conversely, cAMP analogues used at high concentrations (such as dbcAMP) can also act as cell cycle inhibitors and strong inducers of Schwann cell differentiation (Sobue et al., 1986; Bacallao and Monje, 2013). These apparently contradictory observations have been clarified only recently. Thus, it was shown that forskolin is mitogenic at low concentrations (0.2–5  $\mu$ M) and becomes a differentiation factor at higher concentrations (10  $\mu$ M). In parallel, dbcAMP is mitogenic at low concentrations (<100  $\mu$ M) and pro-differentiating at high concentrations (1 mM; Morgan et al., 1991; Monje et al., 2009; Arthur-Farraj et al., 2011; Bacallao and Monje, 2013). Interestingly, we found that only pro-differentiating concentrations of forskolin and dbcAMP can efficiently shuttle HDAC4 into the nucleus of Schwann cells (Fig. 1F). These data suggest that only those conditions that elicit cAMP-signaling that is sufficient to translocate class IIa HDACs into the nucleus can repress *c-Jun* and start the myelin gene program. Our data show that HDAC4 translocation is mediated by the direct phosphorylation of Ser265 and Ser266 by PKA. Nevertheless, other mechanisms are probably also involved as a construct mutant for these two serines can still shuttle into the nucleus in response to cAMP (Fig. 1G).

We show that HDAC4 binds to the promoter of *c-Jun* to regulate its expression in Schwann cells (Fig. 5, A–C). Surprisingly, and at variance with VSMC and other cell types (Vega et al., 2004; Gordon et al., 2009), we found that HDAC4 effects on *c-Jun* are not mediated by Mef2. First, a construct with the N-terminal domain of HDAC4 containing the Mef2 binding site produced no effect on *c-Jun* expression (Fig. 4C). Second, the introduction of point mutations that block the interaction with Mef2 in the full-length HDAC4 3SA GFP did not affect its efficacy to down-regulate *c-Jun* (Figs. 5, D–F). Strikingly, we found that the effects on *c-Jun* are mediated by the C-terminal domain of HDAC4, and depend on its capacity to interact with NCoR1 and recruit a bona fide HDAC. First, we show that the full-length HDAC4 3SA Flag construct reduced the levels of H3K9Ac associated with the *c-Jun* promoter (Fig. 5B). Second, two distinct point mutations in the C-terminal domain that block the interaction of HDAC4 with the NCoR1/HDAC3 complex decreased its efficacy to down-regulate *c-Jun* (Fig. 6, A–E). Finally, *c-Jun* down-regulation by cAMP was reversed by incubation with 2  $\mu$ M TSA, a deacetylase inhibitor that efficiently inhibits class I HDACs (including HDAC3) and class IIb HDACs but not class IIa HDACs (Lobera et al., 2013; Fig. 6F).

In summary, our data suggest that the activation of PKA by cAMP shuttles HDAC4 into the Schwann cell nucleus, where it binds (probably through an unidentified transcription factor) to the *c-Jun* promoter and recruits the NCoR1/HDAC3 complex to block the expression of this gene (Fig. 9). However, although HDAC3 is the most probable effector of this complex, we cannot completely rule out a role for other deacetylases (such as HDAC1) that can form complexes with NCoR1 (Cartron et al., 2013). Indeed, as mentioned before, HDAC1 and HDAC2 have been shown to be central for myelin development, and the combined elimination of both genes in vivo blocks completely PNS myelin development (Chen et al., 2011; Jacob et al., 2011a).

We show that HDAC4 3SA also blocks the expression of *c-Jun* downstream genes such as *Runx2*, *Artemin*, *Gdnf*, and *Olig1*. Interestingly, the activated form of HDAC4 is enough to strongly induce

*Krox20* expression, the master gene for myelin development. It also enhances the gene expression of *HMGCoA reductase* (the rate-limiting enzyme for cholesterol biosynthesis) and of many myelin protein genes such as *Drp2*, *Periaxin*, *Mpz*, and *Pmp22* (Fig. 7, E and F). We also found a statistically significant increase in *Mbp*, but it seems too small to have biological relevance. In contrast, no changes in *Plp* expression were detected. Thus, although HDAC4 3SA can induce a clear change in the gene expression pattern of Schwann cells toward the myelinating phenotype, some genes are not directly regulated by this deacetylase and probably require the activation of other signaling pathways, the identity of which is being currently explored in our laboratory.

Distinct class IIa HDACs can be expressed in the same cell type or tissue, where they can have redundant roles. As it has been discussed above, at least four alleles of class IIa HDACs must be removed to observe a change in the phenotype of muscle fibers (Potthoff et al., 2007). Here we show that, although the removal of HDAC4 or HDAC5 alone from Schwann cells does not have a strong impact, the elimination of both proteins at the same time produces a delay in the activation of the myelin gene expression program that is reflected in a decrease in the density of MSs (Fig. 8, A and B). Our data also suggest that the decrease in myelin density involves a delay in the transition from the promyelin to the myelin-forming stages (Fig. 8B). However, this delay is later compensated and myelination appears normal in older mice (Fig. S6, A–C). A similar phenomenon occurs for other positive regulators of myelination such as *Oct-6* (Jaegle et al., 1996). We do not yet know the identity of the compensatory mechanisms, but it is worth mentioning that Schwann cells express other class IIa HDACs such as HDAC7. Therefore, the possibility exists that they could compensate for the absence of HDAC4 and HDAC5, allowing myelination to proceed and become normalized at later stages. Interestingly, and although *c-Jun* expression is normally repressed in the adult *HDAC4/5 ScKO*, we observed that it is reexpressed more efficiently after nerve injury (Fig. 8, C and D; and Fig. S7). In summary, we propose a model in which class IIa HDACs are pivotal components of an intracellular cAMP sensor mechanism that blocks *c-Jun*, allowing the activation of the myelin gene expression program and differentiation of Schwann cells.

## Materials and methods

### Plasmids

pEGFP-N1 was obtained from Clontech Laboratories. pHDAC4-GFP was provided by C. Brancolini, University of Udine, Udine, Italy (Paroni et al., 2004). pHDAC4 $\Delta$ C-GFP was generated from pHDAC4-GFP by digestion with XcmI restriction enzyme, polishing with T4 DNA polymerase and ligation with T4 DNA ligase. Competent *Escherichia coli* were transformed with the generated plasmid. The correct sequence of the construct was confirmed by sequencing. pHDAC4-GFP 3SA was provided by C. Brancolini (Paroni et al., 2007, 2008). pHDAC4-GFP 3SA D934N, pHDAC4-GFP 3SA H803A, pHDAC4-GFP 3SA L175A, and pHDAC4-GFP 3SA V179A were generated by site-directed mutagenesis following the protocol described in QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) with the primers listed in Table S2. The correct sequence of the construct was confirmed by

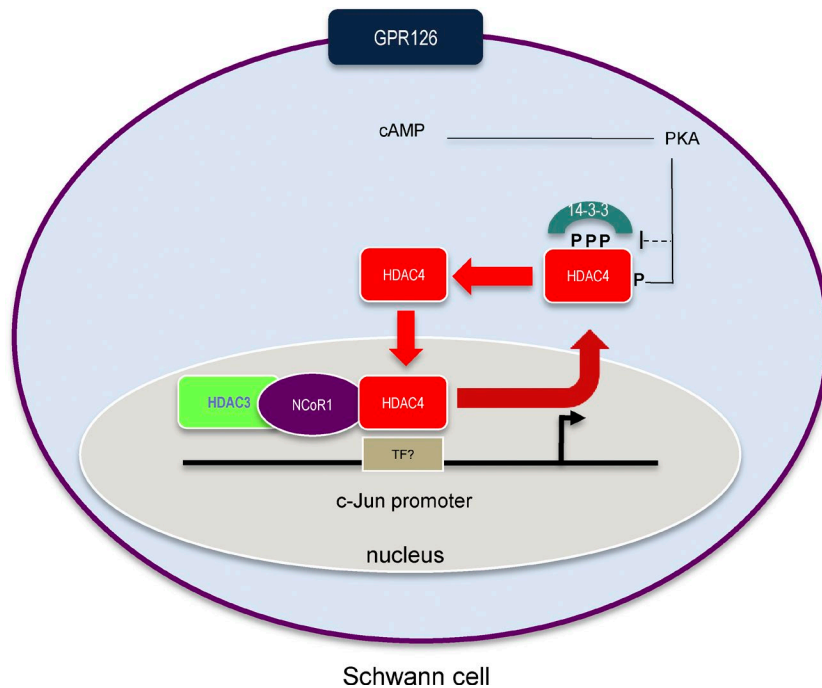


Figure 9. **Proposed working model.** Gpr126 activation raises intracellular cAMP-activating PKA, which phosphorylates HDAC4 in Ser265/266. This (together with another indirect mechanism) shuttles HDAC4 into the nucleus, where it binds to the promoter of *c-Jun* (through a not yet identified transcription factor [TF]) recruiting the NCoR1/HDAC3 complex to block gene expression.

sequencing. HDAC4 shRNAi was obtained from Addgene pENTR/U6 HDAC4 shRNA (32220; Addgene). GFP shRNA was obtained from Addgene pENTR/pTER shEGFP (17470; Addgene). Plasmid purification was performed with the NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel) following the kit instructions.

### Animal studies

All animal work was conducted according to European Union guidelines and with protocols approved by the Comité de Bioética y Bioseguridad del Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Hernández de Elche and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (<http://in.umh.es/>). To avoid suffering, animals were anesthetized before euthanasia. PO-Cre mice were provided by L. Wrabetz (University at Buffalo, Buffalo, NY) and have been previously described in Feltri et al. (1999). HDAC4 floxed mice are described in Lehmann et al. (2018) and Potthoff et al. (2007). The HDAC5 KO mouse was provided by E. Olson (University of Texas Southwestern, Dallas, TX) and described in Chang et al. (2004).

### Cell cultures

Schwann cells were cultured from sciatic nerves of neonatal rats as described previously (Brockes et al., 1979) with minor modifications. We used P3-P4 Wistar rat pups. The sciatic nerves were cut out from just below the dorsal root ganglia and at the knee area. During the extraction and cleaning, the nerves were introduced into a 35-mm cell culture dish containing 2 ml of cold Leibovitz's F-15 medium (Invitrogen) placed on ice. The nerves were cleaned, desheathed, and placed in a new 35-mm cell culture dish containing DMEM with 1 mg/ml of collagenase A (Roche). Subsequently they were cut into very small pieces using a scalpel and left in the incubator for 2 h. Nerve pieces were homogenized using a 1 ml pipette, digestion reaction stopped with complete medium, and the homogenate poured through a 40- $\mu$ m Falcon Cell Strainer (Thermo Fisher Scientific). We then centrifuged the homogenate

at 210 g for 10 min at room temperature and resuspended the pellet in complete medium supplemented with 10  $\mu$ M of cytosine- $\beta$ -D-arabinofuranoside (Sigma-Aldrich) to prevent fibroblast growth. The resuspended cells were then introduced into the poly-L-lysine-coated 35-mm cell culture dishes. After 72 h, the medium was removed and cell cultures expanded in DMEM supplemented with 3% FBS, 5  $\mu$ M forskolin, and 10 ng/ml recombinant NRG1 (R&D Systems). Where indicated, cells were incubated in SATO medium (composed of a 1:1 mixture of DMEM and Ham's F12 medium [Invitrogen] supplemented with ITS [1:100; Gibco], 0.1 mM putrescine, and 20 nM of progesterone; Bottenstein and Sato, 1979).

RT4D6-P2T rat Schwannoma cells (Hai et al., 2002) were obtained from D. Meijer (Centre for Neuroregeneration, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK). HEK 293 cells were obtained from Sigma-Aldrich. The cells were grown in noncoated flasks with DMEM GlutaMAX, 4.5 g/l glucose (Invitrogen) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, and 5% (RT4D6) or 10% (HEK 293) bovine fetal serum. Where indicated, cells were transfected with plasmid DNA using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's recommendations.

### In vivo translocation of HDAC4

P4 rat pups were anesthetized with isoflurane. The sciatic nerve was exposed and immersed in a solution of 1 mM dbcAMP in saline. A control with only saline was also performed. After 1 h, nerves were removed, fixed, and submitted to immunofluorescence with rabbit polyclonal anti-HDAC4 antibody. Schwann cells were identified by Sox10 expression and nuclei counterstained with Hoechst. Samples were mounted with Fluoromount G. Imaging was performed at room temperature on a confocal microscope (TCS SPE; Leica) controlled with Leica confocal software. A 63 $\times$  oil-immersion objective lens (HCXPL APO 1.40-060 OIL  $\infty$ /0.17/E; Leica) was used for analysis.

### Nerve injury experiments

Mice were anesthetised with isoflurane, and the sciatic nerve was exposed and cut at the sciatic notch. The wound was closed using veterinary autoclips. The nerve distal to the cut was excised for analysis after 16 h and fixed with 4% PFA/PBS for 4 h at 4°C, then 15% sucrose/PBS overnight at 4°C, and then embedded in optimal cutting temperature compound. Transverse sciatic nerve cryosections (10 µm) were postfixed with 4% PFA/PBS for 10 min, blocked in 0.2% Triton X-100, 10% horse serum in PBS, and subsequently incubated with primary antibodies in blocking solution overnight at 4°C, followed by 1 h in secondary antibodies and DAPI to identify cell nuclei (1:30,000; Thermo Fisher Scientific). Samples were mounted with Fluoromount G. Imaging was performed at room temperature on a confocal microscope (TCS SPE; Leica) controlled with Leica confocal software. A 40× oil-immersion objective lens (40xHCX PL APO 1.25–0.75 OIL CS; Leica) was used for analysis. All confocal images represent the maximum projection from total stacks from 0–1 mm to the cut point, and six images per animal were counted using ImageJ software (National Institutes of Health).

### Nerve explants

Sciatic nerves from adult mice were extracted and cut into 2-mm-long pieces. We then carefully cleaned the pieces and completely removed the epineurium layer. During these steps, the nerves were kept in 35-mm cell culture dishes containing cold Leibovitz's F-15 medium and placed on ice. The nerve fragments were subsequently transferred to a 24-well plate containing nerve explant medium (DMEM GlutaMAX supplemented with 5% FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 U/ml streptomycin.). Three to four nerve fragments were introduced into each well. As an intact nerve control, the same number of nerve fragments was immediately transferred to an Eppendorf and frozen. After 24 h, total RNA was extracted from the nerve explants and intact nerves.

### Virus generation and Schwann cell infection

Lv HDAC4 shRNA was generated by Gateway technology, following the protocol described in BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System (Invitrogen). As an entry vector, pENTR/U6 HDAC4 shRNA (32220; Addgene) was used, and as a destination vector, pLenti-CMV-GFP-DEST (736-1; 19732; Addgene), was used. Lv GFP was generated in the same way as explained above, but as entry construct, we used pENTR/U6 (17387; Addgene), and as destination vector, pLenti CMV GFP DEST (19732; Addgene). To generate Lv HDAC4-GFP, the HDAC4-GFP cDNA was subcloned to generate a pENTR-hHDAC4-GFP construct, which was transferred into the destination vector pLenti CMV Neo DEST (705-1; 17392; Addgene) using Gateway technology. Constructs were verified by sequencing. 15 µg of the resulting construct were cotransfected with the packaging vectors pCMV-VSV-G (3 µg) and pCMVΔ8.9 (20 µg) into HEK293T cells, following the protocol described in [Campeau et al. \(2009\)](#). 48 h after the cotransfection, the HEK293T medium was collected, filtered, and aliquoted. Premade adenovirus Ad-GFP (000541A) and Ad-HDAC4 3SA Flag (000547A) were obtained from *Abm* and amplified in HEK293 cells as suggested by the manufacturer. Ad CMV Flag was from SignaGen (SL100980). To infect Schwann cells, viral particles

were incubated for 24 h and then removed. Infected Schwann cells were cultured in expansion medium for 5 d (Lv) or 3 d (adenovirus). 24 h before the experiment started, cells were incubated in SATO medium.

### mRNA detection and quantification by RT-qPCR

To extract total RNA from sciatic nerves and cultured rat Schwann cells, we used the Purelink Micro-To-Midi kit and followed 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 Super Script II Reverse transcription (Invitrogen). Control reactions were performed omitting reverse transcriptase. qPCR was performed using the Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System and 5× PyroTaq EvaGreen qPCR Mix Plus (CMB). To avoid genomic amplification, PCR primers were designed to fall into separate exons flanking a large intron when possible. 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  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula. Amplicons were of similar size (≈100 bp) and melting points (≈85°C). Similar amplification efficiency for each product was confirmed by using duplicates of three dilutions for each sample.

### Immunofluorescence and EM studies

For immunofluorescence, cells on coverslips were fixed in 4% PFA/PBS and blocked for 1 h in 10% horse serum and 0.1% Triton X-100 in PBS. Primary antibodies were diluted in blocking solution and incubated overnight at 4°C. Coverslips were then washed with PBS, and detection was performed by applying the appropriate fluorescent secondary Alexa Fluor conjugated antibody (Table S1). Nuclei were counterstained with bisbenzimidazole (Hoechst nuclear stain) in PBS. Samples were mounted in Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates). Anti-Krox-20 immunofluorescence was performed as described by [Le et al. \(2005\)](#). Images were obtained at room temperature using a confocal ultraspectral microscope (TCS SP2; Leica) with a 63× Leica objective (HCXPL APO 1.40–060 oil ∞/0.17/E) and using Leica confocal software. Images were analyzed with the ImageJ software and MetaMorph 7.1.2.0 (Molecular Devices). Immunofluorescence images were also obtained using a Nikon Eclipse TE2000-S fluorescence microscope with a Nikon objective 60× (Plan APO 1.40 OIL 60x ∞/0.17 WD 0.13) or a 20× (S Fluor 20×/0.75 ∞/0.17 WD 1.0), and a camera ORCA AG (C4742-80-12-AG; Hamamatsu Photonics) controlled with the MetaMorph software.

For ultrastructural images, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 40 mg/kg ketamine and 30 mg/kg xylazine and then intracardially perfused with 2% PFA, 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 µm and stained with toluidine blue to check the quality

of the tissue before the EM studies. For EM, 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 1010 Jeol electron microscope with Gatan software and analyzed with ImageJ.

### Immunoprecipitation

Cells were harvested by centrifugation (210 g, 5 min) and washed with PBS twice. Pellets were lysed in 1 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5 mM EDTA 0.5%, Nonidet P-40 with phosphatase, and protease inhibitors and centrifuged 20 min at 12,000 g at 4°C. Supernatants were recovered and precleared. 100 µl of anti-FLAG M1 Agarose Affinity Gel (Sigma-Aldrich) or GFP-Trap agarose beads (Chromotek) were added and samples were incubated overnight at 4°C under gentle rotation. Beads were washed three times with TBS with protease and phosphatase inhibitors, eluted with sample buffer, subjected to SDS-PAGE, and immunoblotted with the indicated antibody.

### SDS-PAGE and immunoblotting

Cells were homogenized at 4°C in radio-immunoprecipitation assay buffer (PBS, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 5 mM EGTA) containing protease inhibitors (Complete MINI tablets; Roche) and, where necessary, phosphatase inhibitors (Phospho STOP tablets; Roche). Protein concentrations were determined by the BCA method (Pierce). 10–50 µg of total protein was subjected to SDS-PAGE and blotted onto Protran nitrocellulose membrane (Whatman). Membranes were blocked and incubated overnight at 4°C with the indicated primary antibody, washed and incubated with secondary antibodies, and developed with ECLplus (GE Healthcare). The secondary antibodies were conjugated with horseradish peroxidase (1:2,000; Sigma-Aldrich).

### ChIPs

The ChIP assay was a modification of the method described by Jang et al. (2006). In brief, cell cultures were incubated in PBS/1% PFA for 25 min at room temperature. Cells were harvested by centrifugation (1,000 g, 3 min) and washed with PBS. The pellet was resuspended in 1.2 ml of buffer A (150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.3% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8, and protease inhibitors), homogenized, and sonicated (20 pulses of 20 s separated by 40 s on ice between each pulse) to “High Power” in the Bioruptor (Diagenode). Chromatin was clarified by centrifugation at 21,000 g for 30 min at 4°C. Protein concentration in the supernatant was quantified by the BCA method (Pierce). An aliquot was saved as input. The volume corresponding to 60–100 µg of protein was incubated with the corresponding antibody overnight at 4°C to form immunocomplexes. Meanwhile, protein A sepharose (CL-4B; GE Healthcare) was resuspended in distilled water and pelleted by centrifugation (<500 g). The resin was resuspended in water with 0.5 mg/ml of bovine albumin and 0.2 mg/ml of sonicated DNA (herring sperm; Sigma-Aldrich). 40 µl of this slurry was added to the immunocomplex and incubated for 1 h at 4°C. Immune complexes were centrifuged (500 g, 3 min)

and washed twice with 1 ml of “low-salt buffer” (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 8.1, 150 mM NaCl, and protease inhibitors; Roche), and then washed once with 1 ml of “high-salt buffer” (the same but with 500 mM NaCl) and washed three times with 1 ml of LiCl buffer (0.25 M LiCl, 1% IGEPAL, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.1, and protease inhibitors). Chromatin from immunocomplexes and input was eluted with 200 µl of 1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, and 200 mM NaCl and incubated at 65°C for 6 h (to break the DNA-protein complexes). DNA was purified using a column purification kit (GE Healthcare) and submitted to SYBR green qPCR with the indicated primers.

### Statistics

Values are given as means ± standard error (SE). Statistical significance was estimated with the Student's *t* test, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, the Mann-Whitney *U* test, and the Kolmogorov-Smirnov test. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant. For the parametric tests (*t* test and ANOVA), data distribution was assumed to be normal (Gaussian), but this was not formally tested. Analysis was performed using GraphPad software (version 6.0). Statistics for each experiment are described in more detail in the legends to figures. In the Tukey's box plots, the bottom and top of the box are the first and third quartiles, and the band inside the box is the median. The “+” sign represents the mean. For the bars, the lowest datum is 1.5 interquartile range of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 interquartile range of the upper quartile.

### Online supplemental material

A list of the antibodies and dilutions used can be found in Table S1. The sequence of the oligonucleotides used for RT-qPCR, ChIP assays, and genotyping is listed in Table S2. Fig. S1 shows the down-regulation of c-Jun in Schwann cells induced by cAMP and quantified by RT-qPCR. Fig. S2 shows the expression of the different class IIa HDACs in Schwann cells and sciatic nerves. Fig. S3 A shows a loss-of-HDAC4-function experiment in RT4D6 Schwannoma cells. Fig. S3 B is an additional control for Fig. 6 A. Fig. S4 shows the induction of Periaxin expression by Ad HDAC4 3SA in Schwann cells, by immunofluorescence. Fig. S5 (A–C) shows the Cre-induced recombination of the *HDAC4<sup>flx/flx</sup>* gene in Schwann cells and its consequences on myelin gene expression. Fig. 5 D shows that myelin gene expression is basically normal in the *HDAC5<sup>-/-</sup>* mice. Fig. S6 shows myelination of sciatic nerves in the *HDAC4/5 ScKO*s at different ages. Fig. S7 shows the induction of c-Jun in nerve explants of different class IIa HDAC *KO*s. Fig. S8 proves that HDAC4 binds to the Runx2 and GDNF promoters.

### Acknowledgments

We would like to thank C. Morenilla-Palao for advice in ChIP and other molecular biology experiments. We thank Dr. Claudio Brancolini for providing phHDAC4-GFP and phHDAC4 3SA plasmids, L. Wrabetz and L. Feltri for PO-Cre mice, E. Olson for HDAC4 floxed and HDAC5 *KO* mice, P. Brophy and D. Sherman



(University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK) for Periaxin antibody, and Dies Meijer for RT4D6 cells. We thank R. Mirsky (University College London, London, England, UK) for insightful comments on the manuscript. We also thank P. Morenilla-Ayala for technical assistance.

J. Backs was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 1118), the European Commission (FP7-Health-2010 and MEDIA-261409), the Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung, and the German Ministry of Education and Research. This work has been funded by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2008-04106, PI012/164, and BFU2016-75864R), Conselleria Educació Generalitat Valenciana (PROMETEO 2008/134), and Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (UGP-15-211) to H. Cabedo. The Instituto de Neurociencias is a “Center of Excellence Severo Ochoa” (Ministerio de Economía y Competitividad SEV-2013-0317).

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: S. Velasco-Aviles, C. Gomis-Coloma, J.A. Gomez-Sanchez, A. Casillas-Bajo, and H. Cabedo performed the experiments. J. Backs provided mice. S. Velasco-Aviles, C. Gomis-Coloma, J.A. Gomez-Sanchez, and H. Cabedo conceived and designed the experiments. H. Cabedo wrote the paper.

Submitted: 25 November 2016

Revised: 6 October 2017

Accepted: 17 January 2018

## References

Arnold, M.A., Y. Kim, M.P. Czubryt, D. Phan, J. McAnally, X. Qi, J.M. Shelton, J.A. Richardson, R. Bessel-Duby, and E.N. Olson. 2007. MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Dev. Cell.* 12:377–389. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.02.004>

Arthur-Farraj, P., K. Wanek, J. Hantke, C.M. Davis, A. Jayakar, D.B. Parkinson, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 2011. Mouse schwann cells need both NR1 and cyclic AMP to myelinate. *Glia.* 59:720–733. <https://doi.org/10.1002/glia.21144>

Arthur-Farraj, P.J., M. Latouche, D.K. Wilton, S. Quintes, E. Chabrol, A. Banerjee, A. Woodhoo, B. Jenkins, M. Rahman, M. Turmaine, et al. 2012. c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron.* 75:633–647. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.021>

Bacallao, K., and P.V. Monje. 2013. Opposing roles of PKA and EPAC in the cAMP-dependent regulation of schwann cell proliferation and differentiation [corrected]. *PLoS One.* 8:e82354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082354>

Backs, J., K. Song, S. Bezprozvannaya, S. Chang, and E.N. Olson. 2006. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 116:1853–1864. <https://doi.org/10.1172/JCI27438>

Backs, J., B.C. Worst, L.H. Lehmann, D.M. Patrick, Z. Jebessa, M.M. Kreusser, Q. Sun, L. Chen, C. Heft, H.A. Katus, and E.N. Olson. 2011. Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4. *J. Cell Biol.* 195:403–415. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105063>

Benito, C., C.M. Davis, J.A. Gomez-Sanchez, M. Turmaine, D. Meijer, V. Poli, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 2017. STAT3 Controls the Long-Term Survival and Phenotype of Repair Schwann Cells during Nerve Regeneration. *J. Neurosci.* 37:4255–4269. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3481-16.2017>

Bottenstein, J.E., and G.H. Sato. 1979. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:514–517. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.514>

Brennan, A., C.H. Dean, A.L. Zhang, D.T. Cass, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 2000. Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. *Dev. Biol.* 227:545–557. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9887>

Brockes, J.P., K.L. Fields, and M.C. Raff. 1979. Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* 165:105–118. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90048-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90048-9)

Brügger, V., M. Duman, M. Bochud, E. Mürger, M. Heller, S. Ruff, and C. Jacob. 2017. Delaying histone deacetylase response to injury accelerates conversion into repair Schwann cells and nerve regeneration. *Nat. Commun.* 8:14272. <https://doi.org/10.1038/ncomms14272>

Campeau, E., V.E. Ruhl, F. Rodier, C.L. Smith, B.L. Rahmberg, J.O. Fuss, J. Campisi, P. Yaswen, P.K. Cooper, and P.D. Kaufman. 2009. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One.* 4:e6529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006529>

Cartron, P.F., C. Blanquart, E. Hervouet, M. Gregoire, and F.M. Vallette. 2014. HDAC1-mSin3a-NCOR1, Dnm3b-HDAC1-Egr1 and Dnm1-PCNA-UHRF1-G9a regulate the NY-ESO1 gene expression. *Mol. Oncol.* 7:452–463. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.11.004>

Chang, S., T.A. McKinsey, C.L. Zhang, J.A. Richardson, J.A. Hill, and E.N. Olson. 2004. Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol. Cell. Biol.* 24:8467–8476. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8467-8476.2004>

Chen, Y., H. Wang, S.O. Yoon, X. Xu, M.O. Hottiger, J. Svaren, K.A. Nave, H.A. Kim, E.N. Olson, and Q.R. Lu. 2011. HDAC-mediated deacetylation of NF- $\kappa$ B is critical for Schwann cell myelination. *Nat. Neurosci.* 14:437–441. <https://doi.org/10.1038/nn.2780>

Feltri, M.L., M. D'Antonio, S. Previtali, M. Fasolini, A. Messing, and L. Wrabetz. 1999. PO-Cre transgenic mice for inactivation of adhesion molecules in Schwann cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 883:116–123. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08574.x>

Fischle, W., F. Dequiedt, M.J. Hendzel, M.G. Guenther, M.A. Lazar, W. Voelter, and E. Verdin. 2002. Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol. Cell.* 9:45–57. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00429-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00429-4)

Fontana, X., M. Hristova, C. Da Costa, S. Patodia, L. Thei, M. Makwana, B. Spencer-Dene, M. Latouche, R. Mirsky, K.R. Jessen, et al. 2012. c-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. *J. Cell Biol.* 198:127–141. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205025>

Gomez-Sanchez, J.A., K.S. Pilch, M. van der Lans, S.V. Fazal, C. Benito, L.J. Wagstaff, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 2017. After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. *J. Neurosci.* 37:9086–9099. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1453-17.2017>

Gordon, J.W., C. Pagiatakis, J. Salma, M. Du, J.J. Andreucci, J. Zhao, G. Hou, R.L. Perry, Q. Dan, D. Courtman, et al. 2009. Protein kinase A-regulated assembly of a MEF2middle dotHDAC4 repressor complex controls c-Jun expression in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 284:19027–19042. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000539>

Guo, L., A.A. Lee, T.A. Rizvi, N. Ratner, and L.S. Kirschner. 2013. The protein kinase A regulatory subunit R1A (Prkar1a) plays critical roles in peripheral nerve development. *J. Neurosci.* 33:17967–17975. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0766-13.2013>

Ha, C.H., J.Y. Kim, J. Zhao, W. Wang, B.S. Jhun, C. Wong, and Z.G. Jin. 2010. PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:15467–15472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000462107>

Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson. 2009. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* 10:32–42. <https://doi.org/10.1038/nrg2485>

Hai, M., N. Muja, G.H. DeVries, R.H. Quarles, and P.I. Patel. 2002. Comparative analysis of Schwann cell lines as model systems for myelin gene transcription studies. *J. Neurosci. Res.* 69:497–508. <https://doi.org/10.1002/jnr.10327>

Han, A., J. He, Y. Wu, J.O. Liu, and L. Chen. 2005. Mechanism of recruitment of class II histone deacetylases by myocyte enhancer factor-2. *J. Mol. Biol.* 345:91–102. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.033>

- Hung, H.A., G. Sun, S. Keles, and J. Svaren. 2015. Dynamic regulation of Schwann cell enhancers after peripheral nerve injury. *J. Biol. Chem.* 290:6937–6950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.622878>
- Jacob, C., C.N. Christen, J.A. Pereira, C. Somandini, A. Baggiolini, P. Lötscher, M. Ozçelik, N. Tricaud, D. Meijer, T. Yamaguchi, et al. 2011a. HDAC1 and HDAC2 control the transcriptional program of myelination and the survival of Schwann cells. *Nat. Neurosci.* 14:429–436. <https://doi.org/10.1038/nn.2762>
- Jacob, C., F. Lebrun-Julien, and U. Suter. 2011b. How histone deacetylases control myelination. *Mol. Neurobiol.* 44:303–312. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8198-9>
- Jacob, C., P. Lötscher, S. Engler, A. Baggiolini, S. Varum Tavares, V. Brügger, N. John, S. Büchmann-Möller, P.L. Snider, S.J. Conway, et al. 2014. HDAC1 and HDAC2 control the specification of neural crest cells into peripheral glia. *J. Neurosci.* 34:6112–6122. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5212-13.2014>
- Jaegle, M., W. Mandemakers, L. Broos, R. Zwart, A. Karis, P. Visser, F. Grosveld, and D. Meijer. 1996. The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation. *Science.* 273:507–510. <https://doi.org/10.1126/science.273.5274.507>
- Jang, S.W., S.E. LeBlanc, A. Roopra, L. Wrabetz, and J. Svaren. 2006. In vivo detection of Egr2 binding to target genes during peripheral nerve myelination. *J. Neurochem.* 98:1678–1687. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04069.x>
- Jessen, K.R., and R. Mirsky. 2005. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:671–682. <https://doi.org/10.1038/nrn1746>
- Jessen, K.R., R. Mirsky, and P. Arthur-Farraj. 2015a. The Role of Cell Plasticity in Tissue Repair: Adaptive Cellular Reprogramming. *Dev. Cell.* 34:613–620. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.09.005>
- Jessen, K.R., R. Mirsky, and A.C. Lloyd. 2015b. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7:a020487. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020487>
- Lahm, A., C. Paolini, M. Pallao, M.C. Nardi, P. Jones, P. Neddermann, S. Sambucini, M.J. Bottomley, P. Lo Surdo, A. Carfi, et al. 2007. Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:17335–17340. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706487104>
- Le, N., R. Nagarajan, J.Y. Wang, T. Araki, R.E. Schmidt, and J. Milbrandt. 2005. Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:2596–2601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407836102>
- Lehmann, L.H., Z.H. Jebessa, M.M. Kreusser, A. Horsch, T. He, M. Kronlage, M. Dewenter, V. Sramek, U. Oehl, J. Krebs-Hauptenthal, et al. 2018. A proteolytic fragment of histone deacetylase 4 protects the heart from failure by regulating the hexosamine biosynthetic pathway. *Nat. Med.* 24:62–72. <https://doi.org/10.1038/nm.4452>
- Liu, Y., and M.F. Schneider. 2013. Opposing HDAC4 nuclear fluxes due to phosphorylation by  $\beta$ -adrenergic activated protein kinase A or by activity or Epac activated CaMKII in skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 591:3605–3623. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.256263>
- Lobera, M., K.P. Madauss, D.T. Pohlhaus, Q.G. Wright, M. Trocha, D.R. Schmidt, E. Baloglu, R.P. Trump, M.S. Head, G.A. Hofmann, et al. 2013. Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group. *Nat. Chem. Biol.* 9:319–325. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1223>
- McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson. 2000. Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:14400–14405. <https://doi.org/10.1073/pnas.260501497>
- Mogha, A., A.E. Benesh, C. Patra, F.B. Engel, T. Schöneberg, I. Liebscher, and K.R. Monk. 2013. Gpr126 functions in Schwann cells to control differentiation and myelination via G-protein activation. *J. Neurosci.* 33:17976–17985. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1809-13.2013>
- Monje, P.V., S. Rendon, G. Athauda, M. Bates, P.M. Wood, and M.B. Bunge. 2009. Non-antagonistic relationship between mitogenic factors and cAMP in adult Schwann cell re-differentiation. *Glia.* 57:947–961. <https://doi.org/10.1002/glia.20819>
- Monje, P.V., J. Soto, K. Bacallao, and P.M. Wood. 2010. Schwann cell dedifferentiation is independent of mitogenic signaling and uncoupled to proliferation: role of cAMP and JNK in the maintenance of the differentiated state. *J. Biol. Chem.* 285:31024–31036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116970>
- Monk, K.R., S.G. Naylor, T.D. Glenn, S. Mercurio, J.R. Perlin, C. Dominguez, C.B. Moens, and W.S. Talbot. 2009. A G protein-coupled receptor is essential for Schwann cells to initiate myelination. *Science.* 325:1402–1405. <https://doi.org/10.1126/science.1173474>
- Monk, K.R., K. Oshima, S. Jörs, S. Heller, and W.S. Talbot. 2011. Gpr126 is essential for peripheral nerve development and myelination in mammals. *Development.* 138:2673–2680. <https://doi.org/10.1242/dev.062224>
- Monuki, E.S., G. Weinmaster, R. Kuhn, and G. Lemke. 1989. SCIP: a glial POU domain gene regulated by cyclic AMP. *Neuron.* 3:783–793. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90247-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90247-X)
- Morgan, L., K.R. Jessen, and R. Mirsky. 1991. The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: Progression from an early phenotype (O4<sup>+</sup>) to a myelin phenotype (P0<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup>, N-CAM<sup>+</sup>, NGF-receptor<sup>+</sup>) depends on growth inhibition. *J. Cell Biol.* 112:457–467. <https://doi.org/10.1083/jcb.112.3.457>
- Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff. 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* 84:767–801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2003>
- Paavola, K.J., H. Sidik, J.B. Zuchero, M. Eckart, and W.S. Talbot. 2014. Type IV collagen is an activating ligand for the adhesion G protein-coupled receptor GPR126. *Sci. Signal.* 7:ra76. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005347>
- Parkinson, D.B., A. Bhaskaran, A. Droggiti, S. Dickinson, M. D'Antonio, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 2004. Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *J. Cell Biol.* 164:385–394. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307132>
- Parkinson, D.B., A. Bhaskaran, P. Arthur-Farraj, L.A. Noon, A. Woodhoo, A.C. Lloyd, M.L. Feltri, L. Wrabetz, A. Behrens, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 2008. c-Jun is a negative regulator of myelination. *J. Cell Biol.* 181:625–637. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803013>
- Paroni, G., M. Mizzau, C. Henderson, G. Del Sal, C. Schneider, and C. Brancolini. 2004. Caspase-dependent regulation of histone deacetylase 4 nuclear-cytoplasmic shuttling promotes apoptosis. *Mol. Biol. Cell.* 15:2804–2818. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-08-0624>
- Paroni, G., A. Fontanini, N. Cernotta, C. Foti, M.P. Gupta, X.J. Yang, D. Fasino, and C. Brancolini. 2007. Dephosphorylation and caspase processing generate distinct nuclear pools of histone deacetylase 4. *Mol. Cell. Biol.* 27:6718–6732. <https://doi.org/10.1128/MCB.00853-07>
- Paroni, G., N. Cernotta, C. Dello Russo, P. Gallinari, M. Pallao, C. Foti, F. Talamo, L. Orsatti, C. Steinkühler, and C. Brancolini. 2008. PP2A regulates HDAC4 nuclear import. *Mol. Biol. Cell.* 19:655–667. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-06-0623>
- Parra, M. 2015. Class IIa HDACs - new insights into their functions in physiology and pathology. *FEBS J.* 282:1736–1744. <https://doi.org/10.1111/febs.13061>
- Parra, M., and E. Verdin. 2010. Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10:454–460. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.004>
- Petersen, S.C., R. Luo, I. Liebscher, S. Giera, S.J. Jeong, A. Mogha, M. Ghidinelli, M.L. Feltri, T. Schöneberg, X. Piao, and K.R. Monk. 2015. The adhesion GPCR GPR126 has distinct, domain-dependent functions in Schwann cell development mediated by interaction with laminin-211. *Neuron.* 85:755–769. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.057>
- Potthoff, M.J., H. Wu, M.A. Arnold, J.M. Shelton, J. Backs, J. McAnally, J.A. Richardson, R. Bassel-Duby, and E.N. Olson. 2007. Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *J. Clin. Invest.* 117:2459–2467. <https://doi.org/10.1172/JCI31960>
- Quintes, S., B.G. Brinkmann, M. Ebert, F. Fröb, T. Kungl, F.A. Arlt, V. Tarabyskin, D. Huylebroeck, D. Meijer, U. Suter, et al. 2016. Zeb2 is essential for Schwann cell differentiation, myelination and nerve repair. *Nat. Neurosci.* 19:1050–1059. <https://doi.org/10.1038/nn.4321>
- Raff, M.C., A. Hornby-Smith, and J.P. Brookes. 1978. Cyclic AMP as a mitogenic signal for cultured rat Schwann cells. *Nature.* 273:672–673. <https://doi.org/10.1038/273672a0>
- Salzer, J.L., and R.P. Bunge. 1980. Studies of Schwann cell proliferation. I. An analysis in tissue culture of proliferation during development, Wallerian degeneration, and direct injury. *J. Cell Biol.* 84:739–752. <https://doi.org/10.1083/jcb.84.3.739>
- Shen, Y.A., Y. Chen, D.Q. Dao, S.R. Mayoral, L. Wu, D. Meijer, E.M. Ullian, J.R. Chan, and Q.R. Lu. 2014. Phosphorylation of LKB1/Par-4 establishes Schwann cell polarity to initiate and control myelin extent. *Nat. Commun.* 5:4991. <https://doi.org/10.1038/ncomms5991>

- Sobue, G., S. Shuman, and D. Pleasure. 1986. Schwann cell responses to cyclic AMP: proliferation, change in shape, and appearance of surface galactocerebroside. *Brain Res.* 362:23–32. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91394-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91394-6)
- Vega, R.B., K. Matsuda, J. Oh, A.C. Barbosa, X. Yang, E. Meadows, J. McAnally, C. Pomajzl, J.M. Shelton, J.A. Richardson, et al. 2004. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell.* 119:555–566. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.024>
- Walkinshaw, D.R., R. Weist, L. Xiao, K. Yan, G.W. Kim, and X.J. Yang. 2013. Dephosphorylation at a conserved SP motif governs cAMP sensitivity and nuclear localization of class IIa histone deacetylases. *J. Biol. Chem.* 288:5591–5605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445668>
- Wu, L.M., J. Wang, A. Conidi, C. Zhao, H. Wang, Z. Ford, L. Zhang, C. Zweier, B.G. Aye, P. Maurel, et al. 2016. Zeb2 recruits HDAC-NuRD to inhibit Notch and controls Schwann cell differentiation and remyelination. *Nat. Neurosci.* 19:1060–1072. <https://doi.org/10.1038/nn.4322>

## Supplemental material

Gomis-Coloma et al., <https://doi.org/10.1083/jcb.201611150>

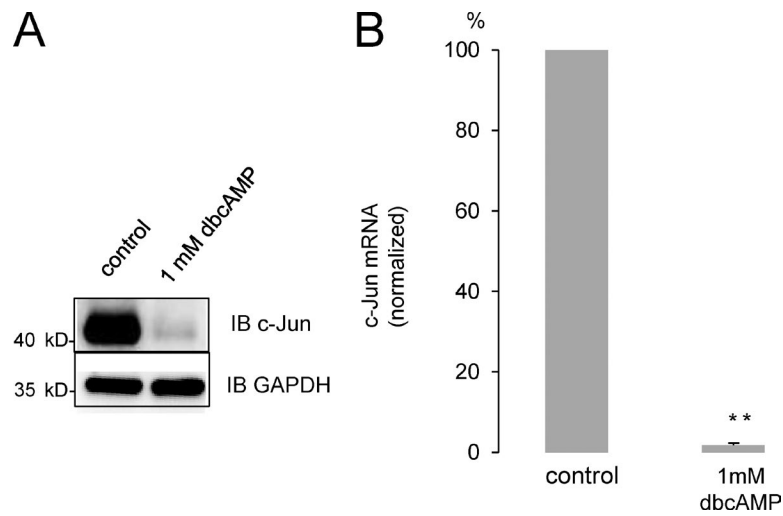
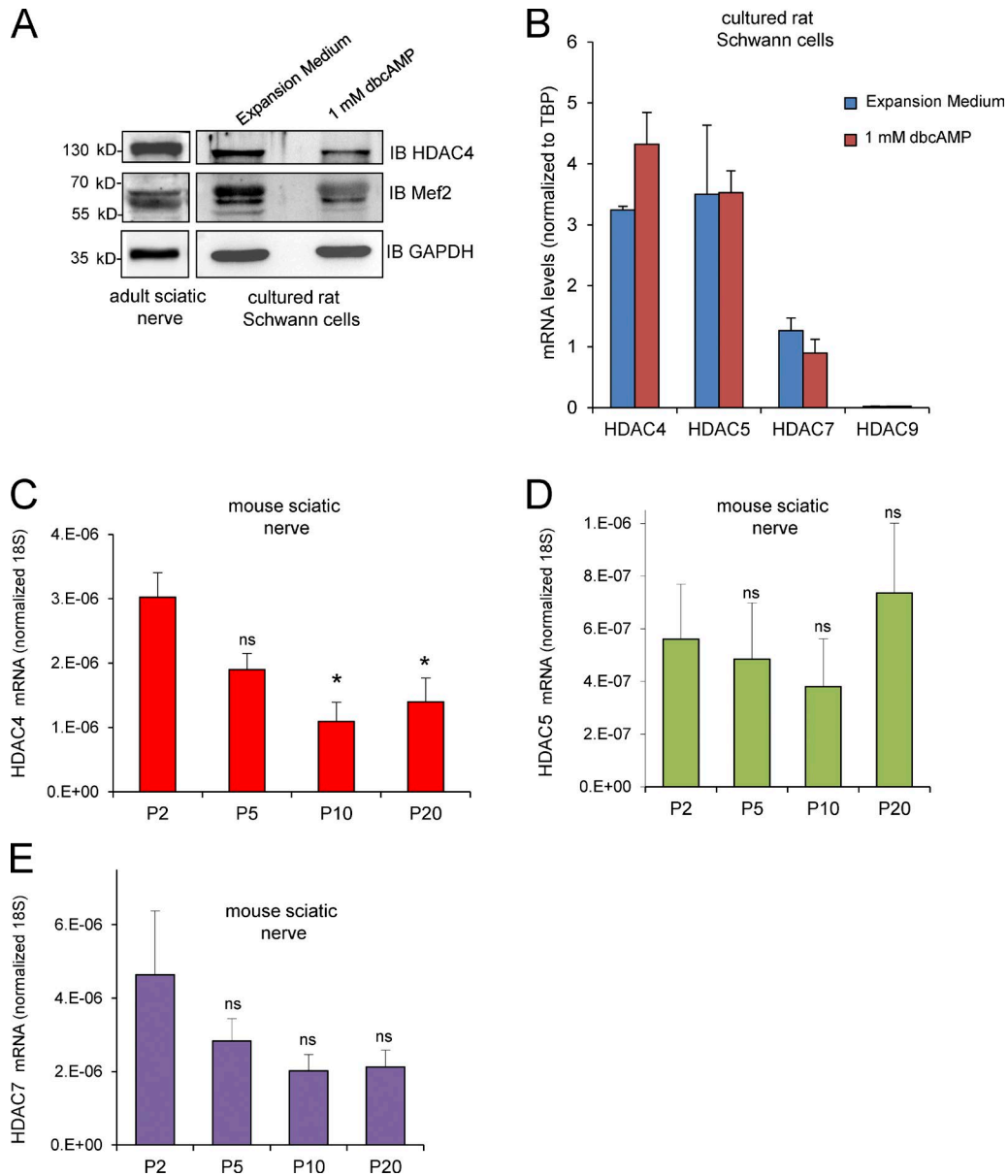


Figure S1. **c-Jun protein down-regulation by dbcAMP correlates with a decrease in mRNA.** **(A)** Cultured rat Schwann cells were incubated with 1 mM of dbcAMP in SATO medium for 24 h, or SATO medium alone, and lysed. An equivalent amount of protein extract was submitted to SDS-PAGE and blotted with anti-c-Jun antibody (IB c-Jun). The same membrane was blotted with anti-GAPDH as an additional loading control. **(B)** cAMP blocks the transcription of *c-Jun* mRNA: in a parallel experiment, total RNA was extracted and mRNA for *c-Jun* determined by RT-qPCR and normalized to *18S*. The result was normalized to SATO alone-incubated cultures. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the *t* test (two-sided). \*\*,  $P < 0.01$ .



**Figure S2. Expression of *Mef2* and class IIa HDACs in mouse peripheral nerves and cultured rat Schwann cells.** (A) C57BL/6 adult mouse sciatic nerves were homogenized in RIPA buffer. Cultured rat Schwann cells were incubated in expansion medium or differentiation medium (1 mM dbcAMP in SATO) for 72 h and lysed in RIPA. Protein extracts were analyzed by Western blot with anti-HDAC4 and anti-Mef2 antibodies. As is shown, both proteins are expressed in sciatic nerves, and proliferating or differentiated Schwann cells. (B) Total RNA was extracted from Schwann cells in expansion or differentiation medium and retrotranscribed to cDNA. SYBR green qPCR was performed with specific primers for class IIa HDACs. Amplicons were similar in size and melting points. The ratio of the relative expression for each gene to the TATA-Box binding protein (*TBP*) gene was calculated by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula. We could detect expression of *HDAC4*, *HDAC5*, and *HDAC7* but not *HDAC9*. Expression of *HDAC5* and *HDAC7* was similar in proliferating and differentiated Schwann cells. *HDAC4* mRNA was slightly up-regulated in differentiated Schwann cells. Data from three different experiments are given as mean  $\pm$  SE. (C-E) Postnatal developmental expression profile of class IIa HDACs in the PNS: total RNA was extracted from sciatic nerves of P2, P5, P10, and P20 C57BL/6j mice and retrotranscribed to cDNA. SYBR green qPCR was performed with specific primers for class IIa HDACs. The ratio of the relative expression for each gene to *18S* was calculated by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula. The mRNA for *HDAC4* is highly expressed at P2 and decreases as myelination proceeds (C and E). The mRNA for *HDAC5* and *HDAC7* is expressed at similar levels during postnatal development (D). Three animals per condition were used. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the *t* test (two-sided). \*,  $P < 0.05$ .

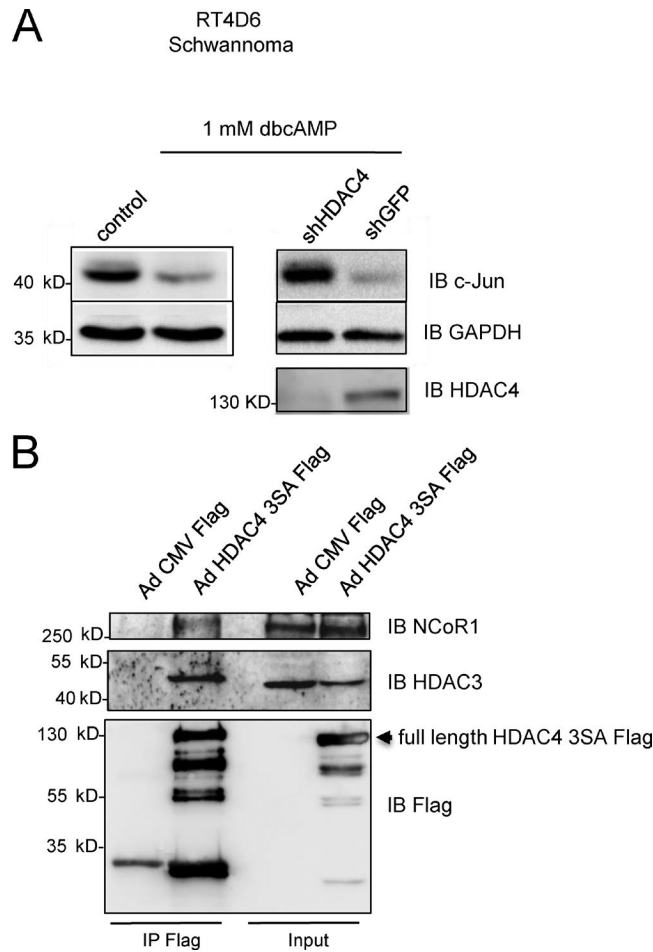


Figure S3. **On the role of HDAC4 in *c-Jun* down-regulation and the mechanism of action.** **(A)** Loss of HDAC4 prevents the down-regulation of *c-Jun* by cAMP in Schwannoma cells. Schwannoma RT4D6 cells were transfected with pENTR/U6 HDAC4 shRNA vector (shHDAC4) or pENTR/pTER shEGFP (shGFP) and incubated for 24 h with 1 mM dbcAMP. Nontransfected cells with and without dbcAMP (control) are also shown. Protein extracts were submitted to SDS-PAGE and immunoblotted against *c-Jun*. Anti-HDAC4 immunoblot shows the loss of HDAC4. GAPDH was used as a loading control. **(B)** HDAC4 interacts with the NCoR1/HDAC3 complex in Schwann cells. Schwann cells were infected with Ad HDAC4 3SA Flag or Ad CMV Flag, lysed, and extracts pulled down with anti-Flag agarose beads. Immunoprecipitates and inputs were immunoblotted with anti-NCoR1 or anti-HDAC3. NCoR1 and HDAC3 were recovered exclusively from Ad HDAC4 3SA Flag-infected cells. Expression and immunoprecipitation of the HDAC4 3SA Flag were checked by immunoblotting with anti-Flag monoclonal antibody.

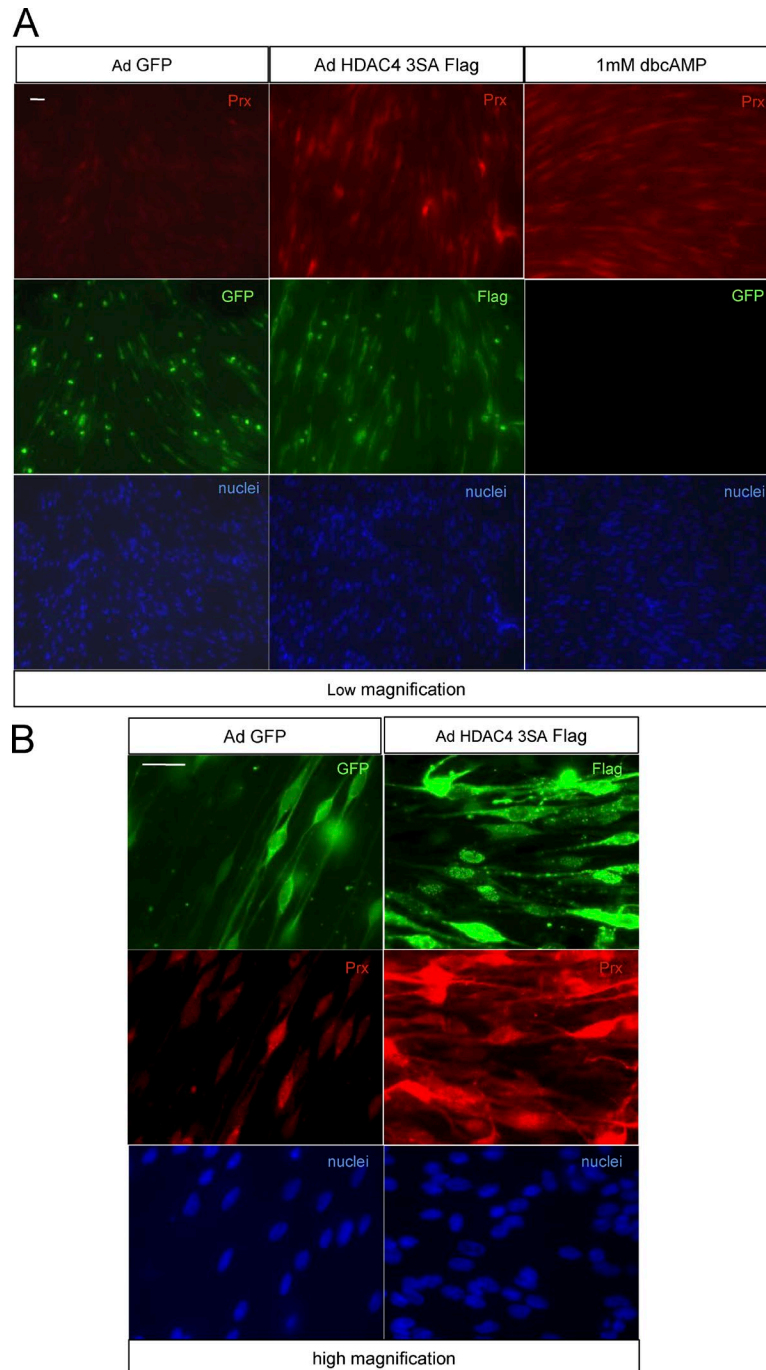


Figure S4. **Nuclear HDAC4 induces expression of Periaxin in Schwann cells.** Schwann cells were infected with Ad HDAC4 3SA Flag or Ad GFP. 72 h after infection, cells were incubated in SATO medium for 24 h, fixed, and submitted to anti-Periaxin immunofluorescence. Infected cells were identified with anti-GFP and anti-Flag antibodies. Nuclei were counterstained with Hoechst. **(A)** Low-magnification images with a panel of 1 mM dbcAMP-treated Schwann cells shown as a positive control. **(B)** High-magnification images of Ad GFP and Ad HDAC4 3SA Flag-infected cells. Bars, 25  $\mu$ m.

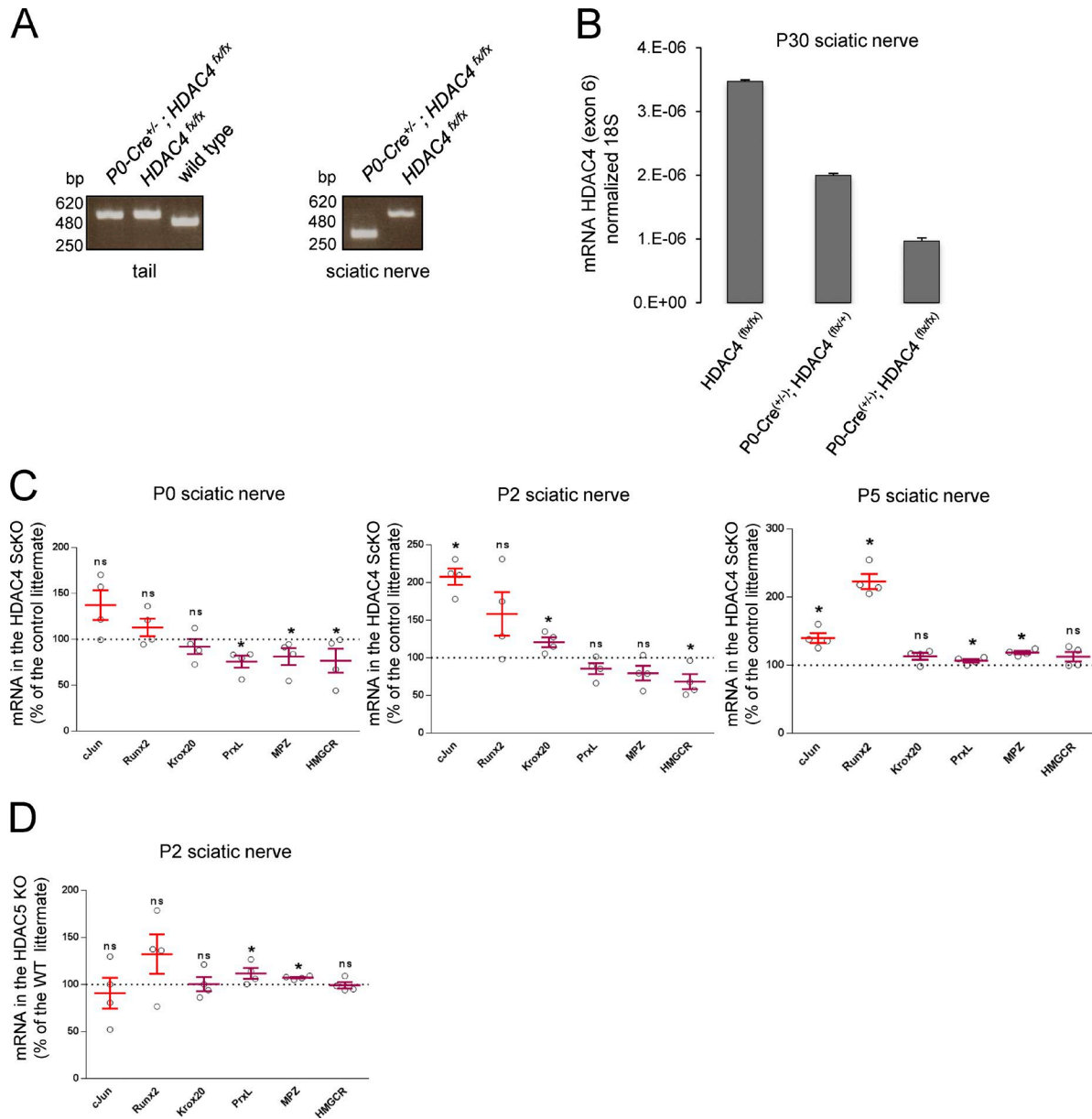


Figure S5. **In vivo elimination of class IIa HDACs in Schwann cells.** (A) Recombination of loxP sites of *HDAC4* in the sciatic nerves by the *P0-Cre* transgene. To detect exon deletion by recombination in Schwann cells in vivo, the sciatic nerves of a *P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>* and a *HDAC4<sup>flx/flx</sup>* littermate were removed and genomic DNA isolated. The tail DNA of these mice and one from a wild type were used as controls. PCR was performed and the products separated by agarose gel electrophoresis. As shown, a band of the expected size for the recombination (250 bp) was observed in the double mutant mouse and not in the floxed littermate. As expected, no recombination could be detected in the tail. (B) mRNA for *HDAC4* is decreased in the conditional KO. To explore if recombination causes a decrease in the expression of the *HDAC4* in conditional KO nerves, total RNA of the sciatic nerves of *P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>*, *P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/+</sup>*, and *HDAC4<sup>flx/flx</sup>* were obtained. mRNA was retrotranscribed to cDNA and SYBR green qPCR performed with specific primers for the *HDAC4* mRNA recombined sequence. The ratio of the relative expression for each gene to 18S was calculated by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula. As is shown, a relationship between gene dose and mRNA levels was observed. The residual expression of mRNA in the conditional KO probably comes from different nerve cell types not expected to express the Cre recombinase (such as fibroblasts, macrophages, vascular cells, and so forth) and/or Schwann cells with an incomplete recombination. Data are given as mean  $\pm$  SE of six technical replicates. (C) Elimination of *HDAC4* in Schwann cells increases *c-Jun* and *Runx2* expression and has a partial impact in myelination markers. mRNA quantification for markers of nonmyelin- and myelin-forming cells in the PNS of *HDAC4* Schwann cell conditional KO. P0, P2, and P5 sciatic nerves were removed and total RNA extracted. RT-qPCR with mouse-specific primers for the indicated genes was performed and normalized to 18S rRNA. The graph shows the percentage of mRNA for each gene in the *P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>* normalized for the control *P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>flx/flx</sup>* littermates. Mice from four different litters were evaluated per genotype. Data were analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test. A scatter plot is shown with the results obtained in each experiment, which include the mean  $\pm$  SE. (D) mRNA quantification for markers of nonmyelin- and myelin-forming cells in the PNS of *HDAC5<sup>-/-</sup>* mice. P2 sciatic nerves were removed and total RNA extracted. RT-qPCR with mouse-specific primers for the indicated genes was performed and normalized to 18S rRNA. The graph shows the percentage of mRNA for each gene in the *HDAC5<sup>-/-</sup>* normalized for the control *HDAC5<sup>+/+</sup>* littermates. No changes in negative regulators of myelination were found. Also, no changes or a slight increase in myelin genes was observed. Mice from four different litters were evaluated per genotype. Data were analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test. A scatter plot is shown with the results obtained in each experiment, which include the mean  $\pm$  SE. \*,  $P < 0.05$ .



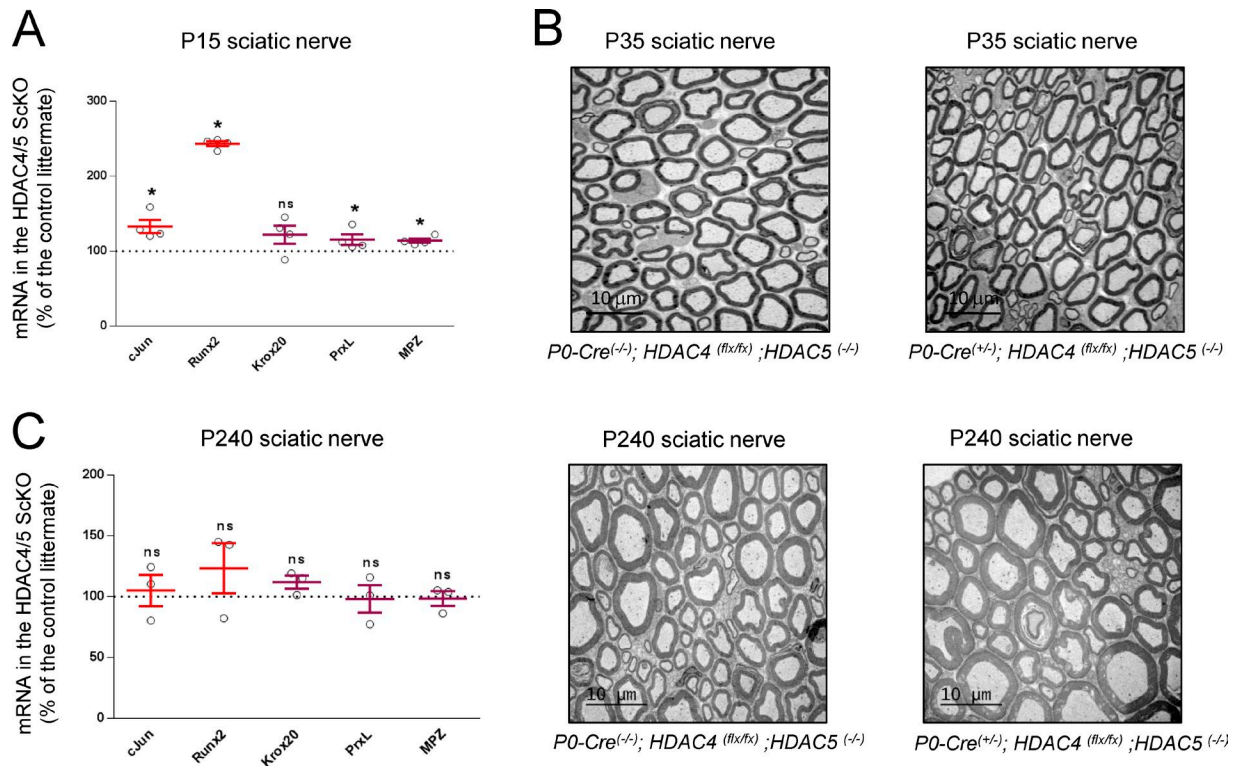


Figure S6. **Myelination in the HDAC4/5 ScKO is not changed at older ages.** (A) Although at P15, *c-Jun* and *Runx2* are still elevated, no change or a slight increase in the expression of myelin genes was observed in the nerves of the HDAC4/5 ScKO. (B) Myelination is morphologically indistinguishable at P35. (C) Older mice (P240) showed no change in either negative or positive regulators of myelination or myelin gross morphology. P15 and P240 sciatic nerves were removed and total RNA extracted. RT-qPCR with mouse-specific primers for the indicated genes was performed and normalized to *18S rRNA*. The graph shows the percentage of mRNA for each gene in the *P0-Cre<sup>+/-</sup>; HDAC4<sup>(flx/flx)</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>* normalized for the control *P0-Cre<sup>-/-</sup>; HDAC4<sup>(flx/flx)</sup>; HDAC5<sup>-/-</sup>* littermates. Mice from three to four different litters were evaluated per genotype. Data were analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test. A scatter plot is shown with the results obtained in each experiment, which include the mean  $\pm$  SE. \*,  $P < 0.05$ . Transmission electron microscopy images from the sciatic nerves of different ages are also shown. Bars, 10  $\mu$ m.

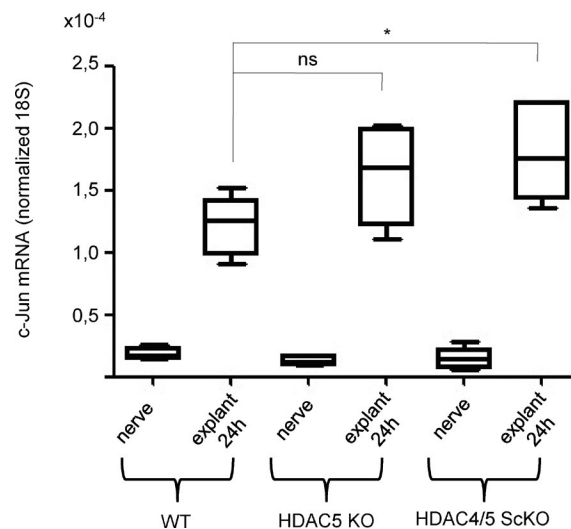


Figure S7. **HDAC4 and HDAC5 are rate-limiting for c-Jun induction after injury.** Nerve explants from HDAC4/5 ScKO, controls (HDAC5 KO), and C57BL/6J mice were incubated in DMEM with 5% FBS for 24 h. Total RNA was extracted and *c-Jun* mRNA determined by RT-qPCR. RNA from nonincubated contralateral sciatic nerve was also extracted to determine the mRNA for c-Jun in the noninjured nerve. A Tukey's box plot is shown. Data from five different experiments were analyzed with the one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test. \*,  $P < 0.05$ .

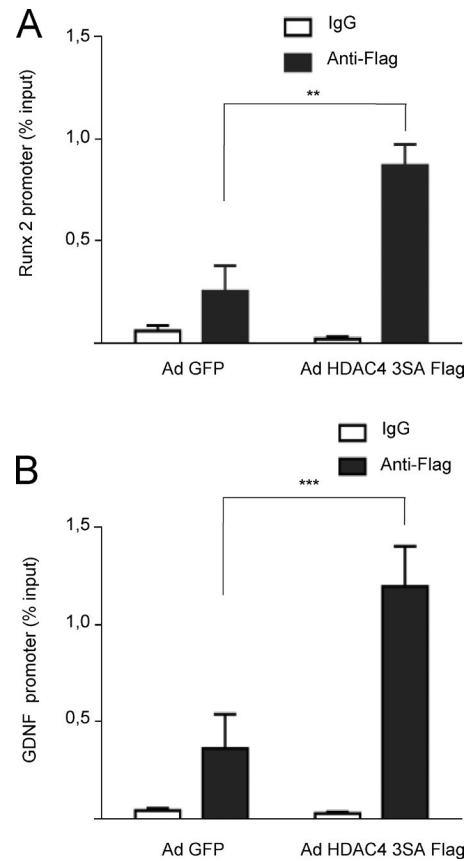


Figure S8. **HDAC4 binds to *Runx2* and *Gdnf* promoters in Schwann cells.** Schwann cells infected with Ad HDAC4 3SA Flag or Ad GFP were cross-linked with PFA. Chromatin was purified and immunoprecipitated with anti-Flag monoclonal antibody or a nonspecific mouse IgG (ChIP grade). qPCR was performed with specific primers for the promoter region of *Runx2* (A) and *Gdnf* (B). As shown, the recovery of *Runx2* and *Gdnf* promoter regions in the immunoprecipitates was enhanced in the HDAC4 3SA Flag-expressing Schwann cells. Nonsignificant recovery was obtained with the nonspecific IgG. Data from three different experiments are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the paired *t* test (two-sided). \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Table S1. **List of antibodies and dilutions used**

Ab	Reference	Company	Species	Dilution	
				IF	WB
c-Jun	9165	Cell Signaling	Rabbit	1:300	1:1,000
Flag M2	F1804	Sigma-Aldrich	Mouse	1:500	1:500
GAPDH	G9545	Sigma-Aldrich	Rabbit	—	1:5,000
GFP	Ab13970	Abcam	Chicken	1:2,000	—
GFP	SC9996	Santa Cruz Biotechnology	Mouse	1:1,000	1:500
H3K9Ac	Ab12179	Abcam	Mouse	—	1:500
HDAC4	SC5245	Santa Cruz Biotechnology	Goat	—	1:500
HDAC4	H0163	Sigma-Aldrich	Mouse	—	1:500
HDAC4	SC-11418	Santa Cruz Biotechnology	Rabbit	1:200	—
IgG	M7769	Sigma-Aldrich	Mouse	—	—
Ki67	Ab15580	Abcam	Rabbit	1:100	—
Krox20	PRB-236P	Covance	Rabbit	1:100	—
Mef2	SC-313	Santa Cruz Biotechnology	Rabbit	1:200	—
Periaxin	<a href="#">Gillespie et al., 1994</a>	Brophy's Laboratory	Rabbit	1:5,000	1:2,000
Sox-10	AF2864	R&D Systems	Goat	1:100	—
Alexa Fluor 488 Donkey anti-chicken	703-545-155	Jackson ImmunoResearch	Donkey	1:1,000	—
Alexa Fluor 488 goat anti-chicken	A11039	Molecular Probes	Goat	1:1,000	—
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	A11001	Molecular Probes	Goat	1:1,000	—
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse	A21202	Molecular Probes	Donkey	1:1,000	—
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse	A11005	Molecular Probes	Goat	1:1,000	—
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit	A11008	Molecular Probes	Goat	1:1,000	—
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit	A21206	Molecular Probes	Donkey	1:1,000	—
Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit	A11010	Molecular Probes	Goat	1:1,000	—
Alexa Fluor 488 chicken anti-goat	A21467	Molecular Probes	Chicken	1:1,000	—
Alexa Fluor 555 donkey anti-goat	A21432	Molecular Probes	Donkey	1:1,000	—

IF, immunofluorescence; WB, Western blot; —, not applicable.

Table S2. List of primers used

Primers	Species	Sequence (5'-3')	
18S	Mouse	Sense	CGGCTACCACATCCAAGGAA
		Antisense	GCTGGAATTACCGGGCT
c-Jun	Mouse	Sense	CCTTCTACGACGATGCCCTC
		Antisense	GGTTCAAGGTCATGCTCTGTTT
DRP2	Mouse	Sense	TGTCCCCAGCCTCAGGTTA
		Antisense	CAACAGTCCCCTTCAAGAGC
HDAC4 deleted exon	Mouse	Sense	AATGCAGTGGTTCAGGTT
		Antisense	AGCACAGAGGTGAAGATG
GDNF	Mouse	Sense	GATTCCGGCCACTTGGAGTT
		Antisense	ATCTTAGAGTCCCCTCCGGC
HDAC4	Mouse	Sense	CATTGGAGGAGCTGCAGACA
		Antisense	GGAAGCCTGACGAACACTGA
HDAC5	Mouse	Sense	GGCATGAACTCTCCCAACGA
		Antisense	CTTCACCTCCACTGCCACAG
HDAC7	Mouse	Sense	CACCTGTCAGACCCAAGTCC
		Antisense	TGCTTGCTGTTGTCTCCACA
HDAC9	Mouse	Sense	TGCAGCAATAAGGAAAAGGCTG
		Antisense	ATGGTTGTTACGTGGCAATG
HMGCR	Mouse	Sense	TGGATCGAAGGACGAGGAAAG
		Antisense	GAATTACGTCAACCATAGCTTCCG
Krox20	Mouse	Sense	ACCCCTGGATCTCCCGTATC
		Antisense	CAGGGTACTGTGGGTCAATGG
MAG	Mouse	Sense	GGAATCAGGAGACATCCCCAA
		Antisense	TTATCCAAAACAGCGGCAGG
MBP	Mouse	Sense	ATCCAAGTACCTGGCCACAG
		Antisense	CCTGTCAACGCTAAAGAAGC
MPZ	Mouse	Sense	ACCAGACATAGTGGGCAAGACCTC
		Antisense	AAGAGCAACAGCAGCAACAGCACC
PMP22	Mouse	Sense	GCTCTGTTCTGTTCTTCTGCC
		Antisense	CACTGTGCCTCACTGTGTAGAT
Prx	Mouse	Sense	AGTGGCCAAGCTGAACATCC
		Antisense	AGAACTCGACGTCAACAGGG
Runx2	Mouse	Sense	GTCTTCCACACGGGGCAC
		Antisense	GCCAGAGGCAGAAGTCAGAG
18S	Rat	Sense	CTTAGAGGGACAAGTGCGC
		Antisense	GGACATCTAAGGCATCACA
Artemin	Rat	Sense	ATCCATTTGAGCTTCGGGGG
		Antisense	CCACCCTTCTTGAGGCAG
ChIP cJun	Rat	Sense	TGAGTGCAAGCGGTGTCTTA
		Antisense	GTCCCCGCTTCAGTAACAAA
ChIP GDNF	Rat	Sense	CCATGAATCGGGAGTAGGAA
		Antisense	CCGGTCAAAGAGCACAACT
ChIP Runx2	Rat	Sense	CCACCCAGCTGCTTGTACTT
		Antisense	TTCACATTCCTGCCCTCAG
cJun	Rat	Sense	AAGAACACAAAGCAGGGAGG

Table S2. List of primers used (Continued)

Primers	Species	Sequence (5'-3')
		Antisense GGGAGTTCATCCGCAATCTA
DRP2	Rat	Sense GAGAAGATCCTGGCCCATTT
		Antisense CCTCAGCTCTCCCTGAAGAA
GDNF	Rat	Sense ACTGACTTGGGTTTGGGCTA
		Antisense CCTGGCCTACCTTGTCCTT
HDAC4	Rat	Sense GACAGCTCGCTGACCTCC
		Antisense CCACTACACAGCCTACAGCC
HDAC5	Rat	Sense GGTCGTAAGCCACACTGGA
		Antisense TCCAGCTTCTGCCGGTAAAG
HDAC7	Rat	Sense CACCTGTCAGACCCAAGTCC
		Antisense TGCTTGCTGTTGTCTCCACA
HDAC9	Rat	Sense CCCAGCATCTGACCTCCAC
		Antisense GAGCCAAGAGCTGCTCCC
HMGCR	Rat	Sense TTGGTGGCCTCCATTGAGAT
		Antisense AGAGGCCATGCATACGGAAA
Krox20	Rat	Sense CCCAATGGTGAAGTGGGAGG
		Antisense TCCAAGGCCTCTTCTCTCC
MBP	Rat	Sense TCCATCCCAAGGAAAGGGGA
		Antisense TCTGCCTCCGTAGCCAAATC
MPZ	Rat	Sense TGCCCTGCTCTTCTCTCTTT
		Antisense CCATAGACTTCCCTGTCCGTC
Olig1	Rat	Sense TGCGGAAGTTATCCTACCC
		Antisense CAGCGTAGCGATCTTGGAGA
PLP	Rat	Sense GGCTAGGACATCCCACAAG
		Antisense TGACACAGGCACAGCAGAG
PMP22	Rat	Sense TTGCAAAGAAATCCAAGCGGA
		Antisense AGAGTAGAAGCATGGTGCTG
Prx	Rat	Sense AATGTGCCGAGCCCTACAAG
		Antisense AGGGGACAGACTCTGGATGT
Runx2	Rat	Sense GCACCCAGCCATAATAGAA
		Antisense TGGAGATGTTGCTCTGTTCG
Sox10	Rat	Sense GCAGAAAGTTAGCCGACCAG
		Antisense GCGCTTGTCACTCTCGTTCA
P0 Cre genotyping	Mouse	Sense CCACCACCTCTCTCCATTGCAC
		Antisense GCTGGCCCAAATGTTGCTGG
HDAC4 floxed genotyping	Mouse	Sense ATCTGCCACCAGATATGTG
		Antisense CTTGTTGAGAACAACTCCTGCAGCT
		Reverse CTCCAATTCTCCACAAGACAGC
HDAC5 KO genotyping	Mouse	Sense CAAGGCCTTGTGCATGCTGGGCTGG
		Antisense CTGCTCCCGTAGCGCAGGGTCCATG
		Reverse GCCCGTTTGGGGACGACGACAGTATTCG
HDAC4 L175A mutagenesis	Human	Sense GAAGTGAAGATGAAGGCACAAGAAATTTGCTCTC
		Antisense GAGGACAAATCTTGTGCCTTCATCTTCACTTC
HDAC4 V179A mutagenesis	Human	Sense GTTACAAGAATTTGCCCTCAATAAAAAGAAGG
		Antisense CCTTCTTTTTATTGAGGGCAAATCTTGTAAAC

Table S2. **List of primers used (Continued)**

Primers	Species	Sequence (5'-3')	
HDAC4 D934N mutagenesis	Human	Sense	CCCCCTGGACACGCTGCGGAGGA
		Antisense	GCTCTCCTCCGCAGCGTGCCAG
HDAC4 H803A mutagenesis	Human	Sense	GTGTCATCAGGCTTCAATGCCGTGGAGGGC
		Antisense	GCCCTCCACGGCATTGAAGCCTGATGACAC

## References

Gillespie, C.S., D.L. Sherman, G.E. Blair, and P.J. Brophy. 1994. Periaxin, a novel protein of myelinating Schwann cells with a possible role in axonal ensheathment. *Neuron*. 12:497-508. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90208-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90208-9)

## Class IIa HDACs in myelination

Sergio Velasco-Aviles, Jose A. Gomez-Sanchez, Hugo Cabedo

Myelin is a highly specialized plasma membrane that wraps around and insulates axons to allow rapid saltatory nerve conduction. Schwann cells produce the myelin sheath in the peripheral nervous system, whereas a distinctly different cell (the oligodendrocyte) myelinates axons in the central nervous system.

Although myelin is largely absent from neonatal peripheral nerves, larger axons are already sorted and wrapped in a 1:1 ratio by individual Schwann cells spaced along their length. Later these cells will up-regulate genes encoding for the enzymes that synthesize lipids, enabling expansion of the plasma membrane to form the myelin sheath, as well as a set of structural proteins that compact and stabilize the myelin. This genetic program is determined by the transcription factor *Egr2* (*krox20*) and involves downregulation of the “negative regulator” of myelination *c-Jun* [1].

It has been demonstrated that a rise in cAMP induced by the G protein-coupled receptor 126 (Gpr126) controls this Schwann cell phenotypic transition *in vivo* [2]. Similarly, differentiation is also observed *in vitro* when Schwann cells are exposed to relatively high concentrations of cAMP analogs or inducers. In contrast a modest increase in cAMP potentiates the mitogenic effects of some trophic factors but has no impact on differentiation. cAMP activates PKA and EPAC with similar potency raising the question of how it might impact differentially on Schwann cells to control the myelination program [3].

Gomis-Coloma et al [4] have recently shown that the cAMP-induced shuttling of class IIa histone deacetylases (HDACs) into the nucleus of Schwann cells is necessary and sufficient to downregulate *c-Jun* and activate the myelin transcriptional program. Translocation is in part mediated by phosphorylation by PKA. Significantly only cAMP-concentrations that induce Schwann cell differentiation translocate class IIa HDACs into the nucleus.

HDACs are classified into four main families: classes I, IIa, IIb and IV. At variance with other families, class IIa HDACs (4,5,7 and 9) have no prominent deacetylase activity, since a pivotal tyrosine in the catalytic site is mutated to histidine [5]. Instead they work mainly as co-repressors of transcription factors such as Mef2. However, Gomis-Coloma et al found that mutations in HDAC4 that block binding to Mef2 do not impair its capacity to downregulate *c-Jun* in Schwann cells.

How then HDAC4 can downregulate *c-Jun* and induce Schwann cell differentiation? It has been elegantly demonstrated by Fischel et al [5] that HDAC4 recruits HDAC3 (a class I HDAC) by forming a multiprotein complex with the NCoR1/SMRT co-repressor. Thus, HDAC4 can recruit a *bona fide* deacetylase, HDAC3, to repress gene expression. Gomis-Coloma et al show that in Schwann cells, HDAC4 indeed binds to the multiprotein complex NCoR1/SMRT-HDAC3. Moreover, mutations that block the interaction of HDAC4 with this complex impair its ability to downregulate *c-Jun*. Finally, these authors demonstrate that the capacity of cAMP to downregulate *c-Jun* in Schwann cells disappears when the deacetylase activity is inhibited with trichostatin A.

How is HDAC4 recruited to the *c-Jun* promoter? Because HDACs do not bind DNA directly, they need to interact with transcription factors to be localized to the target promoters. An obvious candidate is Mef2, but as mentioned before, Gomis-Coloma et al have shown that binding to Mef2 is not necessary to downregulate *c-Jun*. An alternative candidate is *c-Jun* itself, as an AP-1 binding site is located in the *c-Jun* promoter, constituting a positive feedback loop that is probably involved in the rapid expression of this early gene. Further experiments are needed to clarify this point.

Is *c-Jun* the only gene repressed by HDAC4 in Schwann cells? Importantly, the authors have also shown that HDAC4 is recruited to the promoters of *Runx2* and *GDNF*, suggesting that class IIa HDACs can bind and repress directly other genes of non-myelin forming and repair Schwann cells. Suggestively *c-Jun* also binds to these promoters, supporting a role of this transcription factor in the recruitment of HDAC4. Whether it binds the promoters of other negative regulators of myelination (such as *Sox2* and *Ednrb*) needs to be explored.

Using conditional knock out mice, Gomis-Coloma et al also show that the coordinated removal of two class IIa HDACs (HDAC4 and HDAC5) from Schwann cells delays myelin development. Although it supports a central role of these HDACs in the formation of myelin *in vivo*, several questions remain to be answered. Why is it necessary to remove two class IIa HDACs to observe a phenotype? and why does a total arrest of myelination not occur? Although encoded by different genes, all class IIa HDACs share molecular profiles and

regulate equivalent genetic programs in other cells. For instance, it is necessary to remove at least four alleles of some of the skeletal muscle expressed class IIa HDACs to observe a change in muscle fiber phenotype [6]. Thus, a compensatory effect within the members of the family seems to be working in muscle, and is therefore likely to be operative in Schwann cells as well. Importantly Schwann cells also express HDAC7 [4], which could partially compensate for the absence of HDAC4 and HDAC5. Further *in vivo* data will be necessary to clarify these questions.

It was recently shown that Zeb2 represses the negative regulators of myelination *Sox2* and *Ednrb* allowing myelination to proceed [7]. This indicates that the repression of “negative regulators” is pivotal for proper myelination. Gomis-Coloma et al provide evidence showing that the repression of another negative regulator of myelination (*c-Jun*) is also relevant for myelin development. Importantly, the repressor in this case (a class IIa HDAC) is translocated and activated by intracellular cAMP, which links Gpr126-mediated signaling with the myelin transcriptional program in Schwann cells (Figure 1).

## REFERENCES

1. Parkinson DB, et al. J Cell Biol. 2008; 181:625–37. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803013>
2. Petersen SC, et al. Neuron. 2015; 85:755–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.057>
3. Bacallao K, Monje PV. PLoS One. 2013; 8:e82354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082354>
4. Gomis-Coloma C, et al. J Cell Biol. 2018; 217:1249–68. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611150>
5. Fischle W, et al. Mol Cell. 2002; 9:45–57. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00429-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00429-4)
6. Potthoff MJ, et al. J Clin Invest. 2007; 117:2459–67. <https://doi.org/10.1172/JCI31960>
7. Quintes S, et al. Nat Neurosci. 2016; 19:1050–59. <https://doi.org/10.1038/nn.4321>

**Hugo Cabedo:** Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC and Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL)-FISABIO, Alicante, Spain

**Correspondence:** Hugo Cabedo

**Email:** [hugo.cabedo@umh.es](mailto:hugo.cabedo@umh.es)

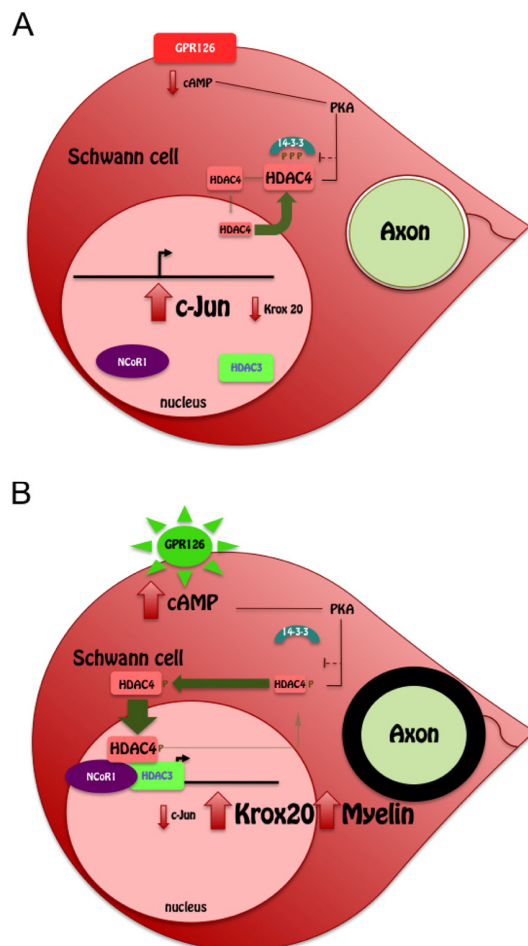
**Keywords:** myelin development, Schwann cells, cAMP, Epigenetics, Histone deacetylases

**Acknowledgements:** We thank R. Mirsky (University College London) for insightful comments on the text

**Copyright:** Velasco-Aviles et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

**Received:** April 30, 2018

**Published:** May 5, 2018



**Figure 1.** (A) At low cAMP concentrations, 14-3-3 sequesters HDAC4 in the cytosol allowing *c-Jun* expression (B). Gpr126 activation raises intracellular cAMP levels activating PKA. This shuttles HDAC4 into the nucleus, where it binds to the promoter of *c-Jun* recruiting the NCoR1/HDAC3 complex to block *c-Jun* expression. Then *Krox20* expression drives myelin development.