



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Funciones de las proteínas asociadas a mielina durante el desarrollo del sistema nervioso central y en neurodegeneración

Vanessa Gil Fernández



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A MIELINA DURANTE EL
DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y EN
NEURODEGENERACIÓN**

Vanessa Gil Fernández
Barcelona, 2010

Programa de Doctorado en Biología Celular
Bienio 2004-2006

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A MIELINA DURANTE EL
DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y EN
NEURODEGENERACIÓN**

Memoria presentada por **Vanessa Gil Fernández**, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor.

Esta tesis ha sido inscrita dentro del programa de doctorado de Biología Celular, bienio 2004-2006, de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados bajo la dirección del Dr. José Antonio del Río Fernández, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, 2010

Director de la tesis
Dr. José Antonio del Río Fernández

La doctoranda
Vanessa Gil Fernández

A mis padres

A Juanvi

“Hace ya algún tiempo que me di cuenta de que, desde mi infancia, había tenido por verdaderas numerosas opiniones falsas, y que lo construido posteriormente sobre principios tan poco firmes no podía dejar de ser altamente dudoso e incierto; de modo que debía emprender seriamente por una vez en mi vida la tarea de deshacerme de todas las opiniones que había tomado hasta entonces por verdaderas, y comenzar completamente de nuevo, desde los cimientos, si quería establecer algo firme y constante en las ciencias”

Rene Descartes, Primera meditación de Meditaciones metafísicas, 1641

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	ix

INTRODUCCIÓN

Prólogo

I. El sistema nervioso central.....	1
1.1 Anatomía macroscópica del SNC.....	2
1.2 Desarrollo del sistema nervioso.....	5
1.2.a Regionalización del tubo neural.....	6
1.2.b Histogénesis del SNC.....	7
II. La regeneración axonal.....	13
2.1 Respuesta astrogliar: cicatriz glial.....	15
2.2 Inhibidores derivados de células meníngeas.....	18
2.3 Inhibidores derivados de oligodendrocitos/mielina.....	19
2.4 Inhibición glial en la evolución.....	21
III. Proteínas asociadas a mielina: funciones no relacionadas con regeneración.....	23
3.1 Nogo-A.....	23
3.2 MAG.....	30
3.3 OMgp.....	32
3.4 NgR1.....	36
3.5 p75 ^{NTR}	38
3.6 TROY/TAJ.....	41
3.7 Lingo-1.....	43
IV. La formación hipocámpica.....	48
4.1 Anatomía básica.....	48
4.2 Interneuronas del hipocampo.....	53
4.3 Principales conexiones de la formación hipocámpica.....	57
4.3.a Conexiones intrínsecas: el circuito trináptico clásico.....	57
4.3.b Las proyecciones asociativas/comisurales.....	59
4.3.c Conexiones extrínsecas: aferencias y eferencias.....	60
4.4 Alteraciones que afectan a la formación hipocámpica.....	61
4.4.a Epilepsia del lóbulo temporal mesial.....	61
4.4.b Enfermedad de Alzheimer.....	64

OBJETIVOS	73
RESULTADOS	79
Capítulo I	79
<i>Análisis del patrón de expresión en desarrollo de la proteína Lingo-1/Lern1 en el cerebro de ratón: Interacción de su dominio intracelular con Myt1l</i>	
Capítulo II	105
<i>Patrón de expresión de OMgp durante el desarrollo del telencéfalo de ratón</i>	
Capítulo III	121
<i>Expresión de Nogo-A en el hipocampo humano durante el envejecimiento normal y en la enfermedad de Alzheimer</i>	
RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	139
1. Proteínas inhibidoras asociadas a mielina (MAIPs) en SNC intacto.....	140
1.1 Expresión de MAIPs durante el desarrollo y en etapa adulta.....	140
1.2 Interacción del complejo Nogo receptor con otros factores.....	145
1.3 OMgp y Lingo-1 podrían modular la función GABAérgica.....	149
1.4 ¿Pueden intervenir los MAIPs en transmisión sináptica?.....	151
1.5 Función de MAIPs en especificidad axonal.....	156
2. MAIPs en condiciones de neurodegeneración en el SNC.....	161
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA	177
ANEXO: factor de impacto de las publicaciones	197

ABREVIATURAS

AD	<u>A</u> lzheimer's <u>D</u> isease
ALS	<u>A</u> myotrophic <u>l</u> ateral <u>s</u> clerosis
AMPc	AMP cíclico
AP	eje <u>a</u> nteroposterior
APP	<u>A</u> myloid <u>P</u> recursor <u>P</u> rotein
Aβ	péptido β - <u>a</u> mioloide
BLyS	<u>B</u> <u>l</u> ymphocyte <u>s</u> timulator
CCK	Colecistoquinina
CE	<u>C</u> orteza <u>E</u> ntorrinal
CSPG	<u>C</u> hondrotin <u>S</u> ulphate <u>P</u> roteo <u>G</u> lycan
DD	<u>D</u> eath <u>D</u> omain
DIV	<u>D</u> ías <i>in vitro</i>
DG	<u>G</u> iro <u>D</u> entado
DRG	<u>D</u> orsal <u>R</u> oot <u>G</u> anglion
DV	eje <u>d</u> orso <u>v</u> entral
EAE	<u>E</u> xperimental <u>A</u> utoimmune <u>E</u> ncephalomyelitis
FAD	<u>F</u> amilial <u>A</u> lzheimer's <u>D</u> isease
FH	<u>F</u> ormación <u>h</u> ipocámpica
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAG	<u>G</u> lucos <u>A</u> mino <u>G</u> lucanos
GFAP	<u>G</u> lial <u>F</u> ibrillary <u>A</u> cidic <u>P</u> rotein
GPI	dominio glucosilfosfatidil inositol
HIPP	<u>h</u> ilar perforant path-associated cell
HNK-1	<u>h</u> uman <u>n</u> atural <u>k</u> iller- <u>1</u>
HSANII	<u>H</u> ereditary sensory and autonomic neuropathy type <u>II</u>
Ig CAMs	<u>I</u> mmunoglobulines <u>C</u> ell <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule
iml	<u>i</u> nnner <u>m</u> olecular <u>l</u> ayer
IN-1	<u>I</u> nhibition <u>N</u> eutralization- <u>1</u>
IS	<u>I</u> nterneurona <u>S</u> electiva
LEA	<u>L</u> ateral <u>E</u> ntorrinal <u>A</u> rea
LERN1	<u>L</u> eucine-rich repeat neuronal protein <u>1</u>
Lingo-1	<u>L</u> RR and <u>I</u> g domain-containing, <u>N</u> ogo <u>R</u> eceptor interacting protein
LRR	<u>L</u> eucin <u>r</u> ich <u>r</u> epeat
LRR-CT	extremo C-terminal rico en Leucina
Lrrn6a	<u>L</u> eucine <u>r</u> ich <u>r</u> epeat neuronal <u>6a</u>
LRR-NT	extremo N-terminal rico en Leucinas
LTD	<u>L</u> ong <u>T</u> erm <u>D</u> epression
LTP	<u>L</u> ong <u>T</u> erm <u>P</u> otentialiation
MAIPs	<u>P</u> roteínas <u>i</u> nhibitorias asociadas a <u>m</u> ielina
MAG	<u>M</u> yelin- <u>A</u> sociated <u>G</u> lycoprotein
MBP	<u>M</u> yelin <u>B</u> asic <u>P</u> rotein
MEA	<u>M</u> edial <u>E</u> ntorrinal <u>A</u> rea
MHC1	<u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex <u>C</u> lass <u>I</u>
mml	<u>m</u> edial <u>m</u> olecular <u>l</u> ayer
MTLE	<u>M</u> esial <u>T</u> emporal <u>L</u> obe <u>E</u> pilepsy
Myt11	<u>M</u> yelin <u>t</u> ranscription factor <u>1</u> -like
NFT	<u>N</u> euro <u>F</u> ibrillary <u>T</u> angles
NgR1	<u>N</u> ogo <u>R</u> eceptor <u>1</u>
NI-250	<u>N</u> eurite growth <u>I</u> nhibitor- <u>250</u>
NI-35	<u>N</u> eurite growth <u>I</u> nhibitor- <u>35</u>

NPY	<u>N</u> européptido <u>Y</u>
O-LM	interneuronas de estratos <u>O</u> riens- <u>L</u> acunosum- <u>M</u> oleculare
OMgp	<u>O</u> ligodendrocyte <u>M</u> yelin glycoprotein
oml	outer <u>m</u> olecular <u>l</u> ayer
PirB	<u>P</u> aired- <u>i</u> mmunoglobulin-like receptor <u>B</u>
PPSE	<u>P</u> otencial <u>P</u> ostsináptico <u>e</u> xcitatorio
RE	<u>R</u> etículo <u>E</u> ndoplasmático
RHD	<u>R</u> eticulon- <u>H</u> omology <u>D</u> omain
RMS	<u>R</u> ostral <u>M</u> igratory <u>S</u> tream
RTN	familia de proteínas <u>R</u> etículo <u>n</u>
SNC	<u>S</u> istema <u>N</u> ervioso <u>C</u> entral
SNP	<u>S</u> istema <u>N</u> ervioso <u>P</u> eriférico
SOM	<u>S</u> omatostatina
S/TR	dominio rico en residuos <u>S</u> erina- <u>T</u> reonina
TAJ	<u>T</u> oxicity <u>a</u> nd <u>J</u> NK inducer
TNF	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor
TNFR	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor
TRAF2	<u>T</u> umor necrosis factor <u>R</u> eceptor- <u>A</u> ssociated <u>F</u> actor <u>2</u>
TrK	<u>T</u> ropomyosin receptor <u>K</u> inase
TROY	<u>T</u> NFR <u>S</u> F expressed <u>o</u> n the mouse embryo
VIP	polipéptido intestinal <u>v</u> asoactivo
VPm	núcleo <u>v</u> entral posterior <u>m</u> edio del tálamo
WNK	<u>W</u> ith <u>N</u> o lysine (<u>K</u>)
ZSV	<u>Z</u> ona <u>S</u> ub <u>V</u> entricular
ZV	<u>Z</u> ona <u>V</u> entricular

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Principales divisiones del SNC humano.....	3
Figura 2. Formación del tubo neural por proceso de inducción neural.....	5
Figura 3. Especificación regional del tubo neural.....	6
Figura 4. Migración radial en la corteza cerebral.....	9
Figura 5. Desarrollo embrionario de la corteza cerebral. Migración radial y tangencial en la corteza cerebral.....	10
Figura 6. Microfotografía de cono de crecimiento axonal.....	12
Figura 7. Diferentes respuestas a la lesión por axotomía en SNP y SNC.....	14
Figura 8. Formación de cicatriz glial en ratón tras lesión.....	16
Figura 9. Inhibición de regeneración axonal mediada por MAIPs.....	20
Figura 10. Inhibición glial durante el desarrollo y en la etapa adulta.....	22
Figura 11. Estructura y topología de membrana de la familia Reticulón (RTN).....	24
Figura 12. Función de Nogo-A en la unión axoglial.....	28
Figura 13. Estructura de componentes de la superfamilia Ig CAMs.....	31
Figura 14. Representación esquemática de OMgp y su localización cromosómica.....	33
Figura 15. Vista ortogonal de la estructura de NgR1.....	36
Figura 16. Complejos de señalización formados por p75 ^{NTR}	40
Figura 17. Niveles de expresión de ARNm de TROY y p75 ^{NTR} en SNC de ratón.....	42
Figura 18. Representación esquemática de la proteína Lingo-1.....	43
Figura 19. Representación esquemática de proteínas transmembrana con LRR.....	45
Figura 20. Mecanismos de señalización de Lingo-1.....	46
Figura 21. Formación hipocámpica de rata.....	49
Figura 22. Sección de hipocampo de ratón teñido con Timm-Nissl.....	50
Figura 23. Distribución de interneuronas según su contenido en proteínas de unión a calcio: Parvalbúmina, Calretinina y Calbindina.....	55
Figura 24. Distribución de interneuronas según su contenido en neuropéptidos.....	56
Figura 25. Conexiones de formación hipocámpica: circuito trisináptico.....	57
Figura 26. Conexiones intrínsecas y extrínsecas de la formación hipocámpica.....	61
Figura 27. Alteraciones histopatológicas en el cerebro de AD.....	64
Figura 28. Vías de procesamiento de APP.....	65
Figura 29. Progresión del avance de AD en relación al proceso de mielinización cortical.....	68

RESULTADOS

Capítulo 1

Figura 1. Patrón específico de Lingo-1.....	85
Figura 2. Expresión de Lingo-1 en cerebro adulto de ratón.....	86
Figura 3. Expresión de Lingo-1 en interneuronas de hipocampo.....	90
Figura 4. Localización subcelular de Lingo-1.....	91
Figura 5. Expresión de Lingo-1 durante el desarrollo de cerebro de ratón.....	92
Figura 6. Asociación de Lingo-1 con NgR1 y p75 ^{NTR}	94
Figura 7. Interacción de Lingo-1 con Myt1l.....	96
Figura 8. Doble colocalización de Lingo-1 y Myt1l en hipocampo.....	97
Figura Supl. 1. Validación de anticuerpo policlonal Lingo-1.....	102

Figura Supl. 2. Localización subcelular de Lingo-1.....	102
Figura Supl. 3. Expresión de Lingo-1 en líneas celulares.....	103
Figura Supl. 4. Expresión de Lingo-1 en oligodendrocitos MAG ⁺	103

Capítulo 2

Figura 1. Caracterización del anticuerpo anti-OMgp.....	110
Figura 2. Expresión durante el desarrollo de OMgp, Nogo-A y MBP.....	110
Figura 3. Patrón de expresión de OMgp durante el desarrollo.....	111
Figura 4. Expresión de OMgp en hipocampo adulto.....	112
Figura 5. Expresión de OMgp en cultivos de hipocampo y sinaptosomas.....	112
Figura 6. Expresión de OMgp en corteza somatosensorial en ratones deficientes en OMgp.....	113
Figura Supl. 1. Expresión de NF1 en hipocampo.....	118
Figura Supl. 2. Corteza somatosensorial de ratones silvestre y ratones deficientes en OMgp.....	119

Capítulo 3

Figura 1. Caracterización del anticuerpo anti-Nogo-A.....	126
Figura 2. Localización de Nogo-A en hipocampo adulto humano control.....	127
Figura 3. Localización de Nogo-A en hipocampo adulto humano en AD.....	129
Figura 4. Inmunoreactividad de Nogo-A en agregados amiloides.....	130
Figura 5. Cambios en niveles de Nogo-A en extractos de cerebro de AD.....	131
Figura Supl. 1. Inmunoreactividad de Nogo-A en paciente de 75 años.....	135
Figura Supl. 2. Inmunoprecipitación de péptido A β y Nogo-A en extractos.....	136

DISCUSIÓN

Figura 30. Análisis de los niveles de expresión de ligandos y receptores.....	143
Figura 31. Niveles máximos de expresión de receptores durante el desarrollo.....	144
Figura 32. Inhibición de regeneración axonal por proteínas asociadas a mielina.....	148
Figura 33. Estructura de PirB y su nivel de expresión en relación a los componentes del complejo Nogo receptor.....	149
Figura 34. Fotografía de interneuronas positivas para Lingo-1 y OMgp.....	150
Figura 35. Posibles mecanismos de señalización de Lingo-1 y receptores TrK.....	151
Figura 36. Efecto de OMgp en la movilización del calcio intracelular.....	153
Figura 37. Nanodispositivo para medir actividad espontánea en cultivos.....	154
Figura 38. Efecto de OMgp en transmisión sináptica de cultivo de hipocampo.....	155
Figura 39. Representación de vía somatosensorial y <i>barrel-field</i>	156
Figura 40. Refinamiento de los axones talámicos en la corteza somatosensorial.....	157
Figura 41. Interacciones del epítipo NHK1.....	160
Figura 42. Respuesta de macrófagos a la lesión en nervio periférico.....	164
Figura 43. Niveles de expresión de OMgp y Lingo-1 en la formación hipocámpica de individuos controles y enfermos de AD.....	167

INTRODUCCIÓN

Prólogo

Esta Tesis fue iniciada a finales del año 2004 en el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Barcelona. Surge a partir de la línea de investigación del Dr. José Antonio del Río sobre las funciones inhibitorias de las proteínas asociadas a mielina en procesos de regeneración en el adulto. Sin embargo, dados los escasos conocimientos que existían acerca de la expresión de algunas de estas proteínas en estadios no adultos, nuestros estudios se centraron en la caracterización del patrón de expresión de Lingo-1 y OMgp, las proteínas menos estudiadas hasta la fecha, en el telencefalo de ratón durante el desarrollo embrionario y postnatal. Por otra parte, numerosas evidencias sugerían que la expresión de algunas de estas proteínas, como Nogo-A, estaba alterada en diversas enfermedades neurodegenerativas, por lo que era probable que también pudiera estar alterada en la enfermedad de Alzheimer.

La introducción de este trabajo aborda el conocimiento actual sobre la expresión y las funciones, no asociadas a regeneración, de las proteínas inhibitorias asociadas a mielina (MAIPs) y de los componentes de su complejo receptor.

I. EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso es un sistema de procesamiento de información, con dos funciones fundamentales: la relación con el medio externo y el control de todos los órganos del individuo. Permite recibir la información, ya sea del exterior o del propio individuo, analizar la situación y elaborar una respuesta. Es por tanto, responsable de coordinar todas las funciones, conscientes e inconscientes del organismo. Su unidad funcional es una célula altamente especializada denominada *neurona*, cuya característica principal reside en la capacidad de generar a ambos lados de su membrana, y conducir a lo largo de ella, una diferencia de potencial eléctrico. La función primordial de la neurona es integrar la información que le llega a través de contactos sinápticos y emitir señales a otras neuronas. Las neuronas se acompañan por otros tipos celulares, conocidos con el nombre de glía y que incluye a *astrocitos*, *oligodendrocitos* y *microglía*, los cuales actúan, no sólo como soporte trófico, sino también como parte activa en las sinapsis (Kandel et al., 2000; Purves et al., 2001).

El sistema nervioso se puede dividir anatómica y funcionalmente en otros dos sistemas: **Sistema nervioso central (SNC)** formado por el *encéfalo* y la *médula espinal*. Se encuentra protegido por tres membranas, las meninges. En su interior existe un sistema de cavidades conocidas como ventrículos, por los cuales circula el líquido cefalorraquídeo. Funcionalmente, es el encargado de la integración de la información y elaboración de la respuesta.

Sistema nervioso periférico (SNP) formado por los *nervios craneales* y *espinales*, que emergen del sistema nervioso central y que recorren todo el cuerpo, conteniendo axones de vías neurales con diferentes funciones, y también por los *ganglios periféricos*, que se encuentran en el trayecto de los nervios y que contienen cuerpos neuronales, los únicos fuera del sistema nervioso central. Funcionalmente, es el sistema receptor de la información sensorial pero también el sistema efector a través del cual el SNC ejerce sus funciones.

El sistema nervioso, y en particular el encéfalo, no es un órgano homogéneo desde el punto de vista citoarquitectónico. Existen, básicamente dos tipos de organización: *núcleos* y *estructuras laminadas*. Los núcleos son agrupaciones de células cuyos límites están más o menos delimitados, y se localizan en todos los niveles

anteroposteriores (AP) y dorsoventrales (DV) del SNC. Como ejemplo podemos citar: el núcleo *accumbens*, el *caudatus putamen*, los núcleos geniculados del tálamo, los núcleos profundos del cerebelo o los núcleos motores de la médula espinal. En cuanto a las estructuras laminadas, éstas son estructuras más modernas y complejas y contienen un número diverso de capas que va desde tres, como el hipocampo y cerebelo, hasta 6 capas, como el bulbo olfativo y la neocorteza. El número de capas es un indicador de la complejidad evolutiva en el SNC. De hecho, la neocorteza es la región más compleja del cerebro de los mamíferos, y de ella emanan la mayor parte de las funciones que nos distinguen como seres humanos, como el pensamiento, el habla o la emoción.

Como ya se ha comentado, el tejido nervioso está formado por una red de neuronas interconectadas entre sí. Sin embargo, existe una diferencia en el tipo de conectividad que las neuronas pueden establecer, por lo que podemos diferenciar dos tipos de neuronas:

Neuronas de proyección, son aquéllas que forman sinapsis con regiones lejanas a donde reside el cuerpo celular, por lo que transmiten la información de unas áreas a otras formando vías neurales. Su proyección puede ser *ipsilateral* (el axón sale del área pero no del hemisferio cerebral) o *contralateral* (el axón cruza la línea media y contacta con una diana situada en el hemisferio contralateral). Su transmisión es mayoritariamente excitadora y, aunque existen diversos neurotransmisores, el principal es el glutamato (Peters and Jones, 1984)(Ramon y Cajal, 1911).

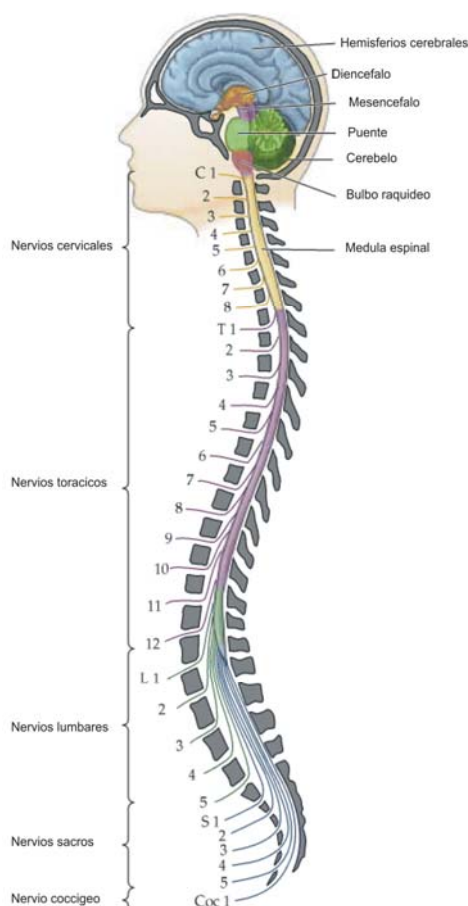
Interneuronas o neuronas de circuito local. Son aquellas neuronas cuyo axón establece conexiones en la misma área en la que reside el soma. Por tanto, poseen una función principalmente de modulación de la transmisión de información. Mayoritariamente son inhibitorias y utilizan el ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor principal (Fairen et al., 1984; Marin, 2002).

1.1 Anatomía macroscópica del SNC

A nivel macroscópico, el SNC está formado por *encéfalo* y la *médula espinal*. La **médula espinal** es la parte más caudal del SNC. Recibe información sensitiva de la piel, las articulaciones y la musculatura del tronco y de las extremidades y contiene todas las neuronas motoras responsables tanto de los movimientos reflejos como

voluntarios. En conjunto, es la parte menos compleja de todo el SNC y presenta una apariencia segmentada, donde los segmentos se clasifican en cuatro grupos (o regiones) principales: cervicales, torácicos, lumbares y sacros, según el nivel AP. La citoarquitectura de los segmentos es simple, presentando una organización en núcleos, sin ningún tipo de laminación. La sección transversal de la médula muestra que está formada por dos áreas: *sustancia gris* (que contiene los cuerpos celulares y dendritas neuronales) y *sustancia blanca* (axones mielinizados agrupados en fibras formando columnas de proyecciones ascendentes o descendentes) (Kandel et al., 2000; Purves et al., 2001) (Figura 1).

En el **encéfalo** se distinguen seis regiones: bulbo raquídeo, puente, mesencéfalo, cerebelo, diencefalo y hemisferios cerebrales. Cada una de estas regiones se puede subdividir en varias áreas diferenciadas desde el punto de vista anatómico y funcional.



El *bulbo raquídeo*, el *puente* y el *mesencéfalo* forman en conjunto una estructura denominada **tronco del encéfalo**.

Participan en el control motor de los músculos de la cabeza, a la vez que recogen información sensorial de la piel y musculatura craneal. Además, el tronco del encéfalo regula los estados de vigilia y consciencia. El **bulbo raquídeo**, que es la continuación de la médula espinal en dirección rostral, contiene los centros responsables del control de funciones vitales autónomas como la digestión, la respiración, la presión sanguínea y el ritmo cardíaco (Kandel et al., 2000).

El **mesencéfalo** contiene núcleos esenciales para el sistema visual y auditivo mediante los cuales se controlan muchas funciones sensoriales y motoras, como por ejemplo el movimiento ocular y la coordinación del reflejo visual.

Figura 1. Principales divisiones del SNC humano. Adaptado de Purves et al., 2001.

El **cerebelo** coordina espacio-temporalmente la fuerza y variedad de los movimientos de la musculatura esquelética y, además, está implicado en el aprendizaje de aptitudes motoras. Para ello, integra la información somatosensorial recibida de la médula espinal a través del puente, la información motora de la corteza cerebral y la información de equilibrio del oído interno. La superficie del cerebelo está dividida en varios lóbulos funcionalmente independientes. A nivel citoarquitectónico, el cerebelo tiene una estructura laminada en la región más externa y en forma de núcleos en la zona más interna.

El **diencéfalo** presenta cuatro grandes regiones: *epitálamo*, *tálamo*, *hipotálamo* y *subtálamo*. El tálamo procesa gran parte de la información sensorial y motora que llega a la corteza. También regula los niveles de consciencia y aspectos emocionales de experiencias sensitivas. El hipotálamo regula el sistema nervioso autónomo y la secreción hormonal de la glándula pituitaria. Al igual que el tálamo, el hipotálamo está organizado en núcleos.

Los **hemisferios cerebrales** forman la región más grande del encéfalo humano. Consisten en la *corteza cerebral*, la sustancia blanca subyacente, y tres estructuras profundas: *ganglios basales*, *amígdala* y *formación hipocámpica*. Los dos hemisferios están conectados entre sí por un conjunto de fibras nerviosas llamado *cuerpo calloso*. Los ganglios basales están relacionados con el control de los movimientos finos, la amígdala con la conducta social y la expresión de emociones y la formación hipocámpica con la memoria y el aprendizaje. La corteza cerebral y la formación hipocámpica son estructuras complejas de organización laminada, aunque poseen distinto número de capas. En cambio, la amígdala y los ganglios basales se organizan histológicamente de forma más simple, formando núcleos.

La corteza cerebral se ocupa fundamentalmente del procesamiento de la información sensitiva o de la emisión de órdenes motoras. Las *áreas primarias* intercambian información directamente con regiones subcorticales del SNC; en cambio, las *áreas secundarias o terciarias* transmiten o integran la información procedente de áreas primarias. Globalmente, se puede considerar que la información sensorial llega a áreas sensoriales primarias donde es procesada y transmitida a regiones más especializadas de la corteza sensorial (áreas secundarias o terciarias). Desde ahí la información pasa a

áreas de asociación donde se integra y se origina la respuesta que se propaga por áreas motoras (terciarias, secundarias y finalmente primarias) (Kandel et al., 2000).

1.2 Desarrollo del sistema nervioso

El embrión de los mamíferos se forma a partir de tres capas principales: endodermo, mesodermo y ectodermo. El *endodermo*, que es la más interna, da lugar al intestino, pulmones e hígado; el *mesodermo* que es la capa media, da origen a los tejidos conjuntivos, músculo y aparato vascular, y el *ectodermo*, la capa más superficial, origina la epidermis y el sistema nervioso central y periférico (Gilbert, 2006; Kandel et al., 2000).

En la parte dorsal del embrión y, a lo largo de toda su línea media, se diferencia una capa de células ectodérmicas en *neuroectodermo*, el cual dará origen a todas las células neurales y gliales. Este neuroectodermo se diferencia del ectodermo que lo rodea por un proceso conocido como **inducción neural**, y es llevado a cabo por señales moleculares enviadas desde el mesodermo adyacente, concretamente desde un tejido transitorio denominado *notocorda*. De no producirse estas señales, todo el tejido sería por defecto ectodermo. Según va adquiriendo propiedades neurales, el neuroectodermo formará la *placa neural* a lo largo de todo el eje AP. Poco después de formarse la placa neural, ésta comienza a plegarse hacia el interior del embrión para formar una estructura tubular llamada *tubo neural* (proceso de neurulación). En la fusión del tubo se separan unos grupos de células del neuroectodermo más dorsal formando las *crestas neurales* (Figura 2).

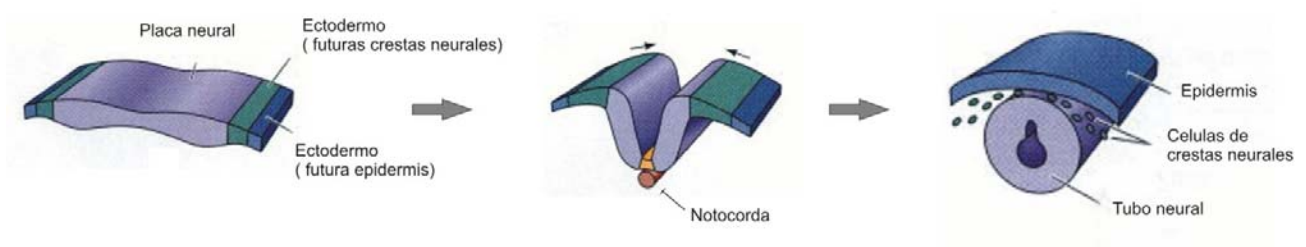


Figura 2. Desarrollo del ectodermo y formación del tubo neural por proceso de inducción neural. Definición del eje dorsoventral. Adaptado de Gilbert et al., 2006.

El SNC se formará a partir del tubo neural, mientras que el SNP lo hará a partir de las células de las crestas neurales ((Knecht and Bronner-Fraser, 2002) para revisión). La cavidad interna generada por la fusión del tubo formará el canal central y dará lugar al sistema ventricular del sistema nervioso. Las células del tubo neural se denominan *epitelio neural*, zona de proliferación a partir de la cual se generarán todas las neuronas y la mayoría de células gliales que encontramos en el SNC.

1.2.a Regionalización del tubo neural

Definición del eje AP. Una vez formado el tubo neural, se produce una especificación regional en él tanto en sentido del eje AP como en el del eje DV. La configuración rostrocaudal del tubo neural viene determinada por la expresión específica y combinada de diversos genes de segmentación Hox (Kandel et al., 2000; Purves et al., 2001).

De la parte anterior del tubo neural emergen las tres vesículas que darán lugar al encéfalo: el **prosencefalo**, el **mesencefalo** y el **rombencefalo**. La médula espinal se diferenciará de la región más caudal del tubo neural. Esta situación se conoce como *estadio de tres vesículas*. En el momento de la generación de las vesículas comienza la flexión del tubo neural, por los puntos cefálico y cervical. Posteriormente, la diferenciación del tubo neural se continúa con la división de dos de las tres vesículas, el prosencefalo y el rombencefalo. El prosencefalo se subdivide en dos **vesículas telencefálicas** simétricas y una **vesícula diencefálica**. En cuanto al rombencefalo, éste se subdivide en **metencefalo** y **mielencefalo**. Con estas divisiones se generan cinco vesículas, que junto a la médula espinal darán origen a las partes principales del SNC (Figura 3).

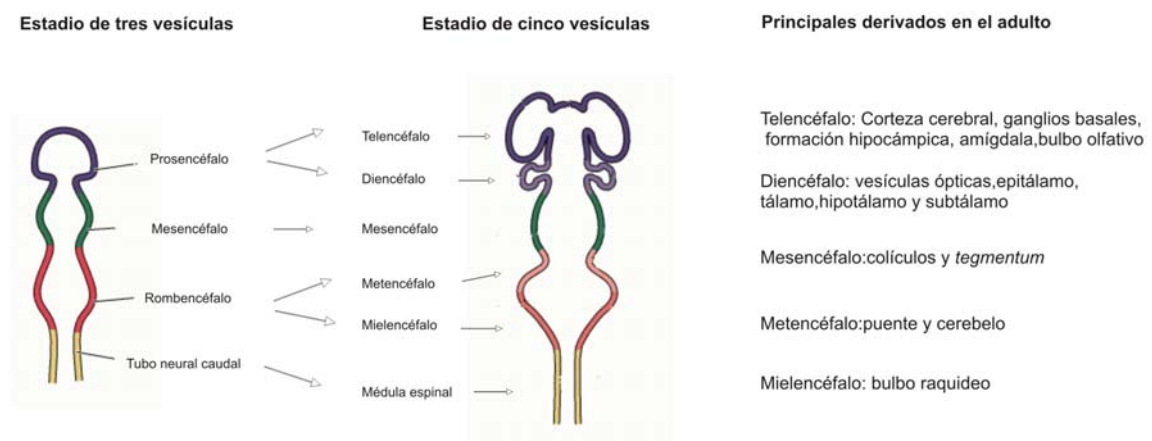


Figura 3. Especificación regional del tubo neural. Definición del eje anteroposterior. De la parte anterior del tubo neural se diferencian tres vesículas: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, que se subdividirán para dar lugar a las diversas regiones del encéfalo. De la parte posterior del tubo se desarrolla la médula espinal. *Adaptado de Purves et al., 2001.*

Definición del eje DV. La expresión de determinados factores por tejidos circundantes no neurales, *Sonic hedgehog* por notocorda, *ácido retinoico* por somitas y *BMP4*, *BMP7* por epidermis, producen la especialización dorsal o ventral del tubo neural, que se mantendrá a lo largo de toda su longitud AP. Esta especialización regional resulta determinante para los procesos de migración posteriores. Así, las regiones dorsales formarán en la mayoría de casos estructuras laminadas, mientras que las regiones ventrales se estructurarán principalmente en núcleos (Hatten, 1999; Hatten, 2002; Marin and Rubenstein, 2003; Wilson and Rubenstein, 2000). Estos factores no sólo actúan como inductores, sino también como *morfógenos*, un tipo de señal inductora que puede dirigir diferentes destinos celulares a partir de diferentes umbrales de concentración. La combinación de la información procedente de la regionalización del eje AP con la información procedente del eje DV determinará el tipo celular en el cual las células se diferenciarán.

1.2.b Histogénesis del SNC

Del neuroepitelio de las vesículas encefálicas surgirán todas las células neurales y gliales que conforman el SNC. Además, todas las células deben realizar un proceso que incluye unas pautas específicas como son: proliferación, migración y diferenciación. Aunque este proceso es similar para todas las estructuras del SNC, nos centraremos en la formación de estructuras laminadas.

Proliferación. Al principio del desarrollo neural, las células progenitoras proliferan rápidamente y originan progenitores adicionales mediante divisiones simétricas, expandiendo la población de precursores, lo que engrosará la pared del tubo neural. Este fenómeno da lugar a la formación de dos zonas de proliferación: *zona ventricular (ZV)* y *zona subventricular (ZSV)*. Posteriormente, las células se dividirán de modo asimétrico, generando en cada división una célula postmitótica que sale del ciclo celular para generar una neurona o célula glial y otra célula que sigue inmersa en el ciclo para generar nuevas divisiones asimétricas. Conforme avanza la neurogénesis, la capacidad

proliferativa se va reduciendo y un mayor número de células progenitoras se dividen de forma simétrica para producir dos células postmitóticas (Cremisi et al., 2003; Chenn and McConnell, 1995). La neurogénesis se produce durante los estadios embrionarios, siendo las neuronas granulares del cerebelo y del giro dentado las únicas que se generan en el periodo postnatal (Rakic, 2007). La tasa de proliferación no es homogénea en todo el tubo neural, de forma que aquellas regiones con mayor tasa (regiones dorsales) generarán estructuras de mayor tamaño. Esta diferencia en tasa de proliferación también explica las diferencias en el tamaño cerebral entre distintas especies, pues todos los organismos parten de un neuroepitelio muy similar.

Migración. Las células postmitóticas no permanecen en el lugar de su generación, sino que al abandonar el ciclo celular se mueven hasta sus posiciones definitivas mediante un proceso denominado *migración celular*. Esta característica es una de las principales diferencias del tejido nervioso respecto a los demás tejidos del organismo. La migración celular sucede de modo diferente en función de distintas variables: región del tubo neural donde se originan, tipología celular e incluso de la especie animal. La migración es un proceso esencial para el SNC puesto que deficiencias en migración y en el posicionamiento de las neuronas causan problemas tan graves como retraso mental, epilepsia o deficiencias en el aprendizaje (Hatten, 2002; Marin and Rubenstein, 2003).

Existen dos métodos de migración empleados por las células basados en su orientación y en el soporte/sustrato que utilizan: la migración radial y la migración tangencial (Nakajima, 2007; Rakic, 2007).

La **migración radial** es aquella que se produce en el eje perpendicular de la extensión del tubo neural, es decir desde la luz ventricular hasta la superficie externa (superficie pial). Este tipo de migración, utilizado por el 80-90% de precursores neuronales, da lugar principalmente a estructuras laminadas, y su conocimiento proviene principalmente del estudio del desarrollo de la placa cortical de la corteza cerebral. Aunque los mecanismos que gobiernan este proceso son similares para otras regiones del telencéfalo, se debe tener en cuenta que pueden existir diferencias con la migración radial que acontece en estructuras carentes de laminación, como por ejemplo el estriado. En la migración radial, las células postmitóticas migran dependiendo de un tipo celular específico, la **glía radial** (Rakic, 1972; Rakic, 1974; Rakic, 2003). La glía radial es uno

de los primeros tipos celulares que se diferencian en el epitelio neural. Sus núcleos se localizan en las capas proliferativas extendiendo dos prolongaciones opuestas, una corta hacia la superficie ventricular y otra más larga dirigida hacia la superficie pial. Esta prolongación es la que conforma el sustrato físico al cual se adhieren las células que van a migrar. Las células en migración adquieren una morfología bipolar y, mediante uniones tipo GAP (Elias et al., 2007), se adhieren a la prolongación larga de la glía radial y se desplazan a lo largo de ella. El conjunto de todas las células de glía radial constituye un andamio por el que ascienden las células hasta posicionarse en sus estratos definitivos (Figura 4).

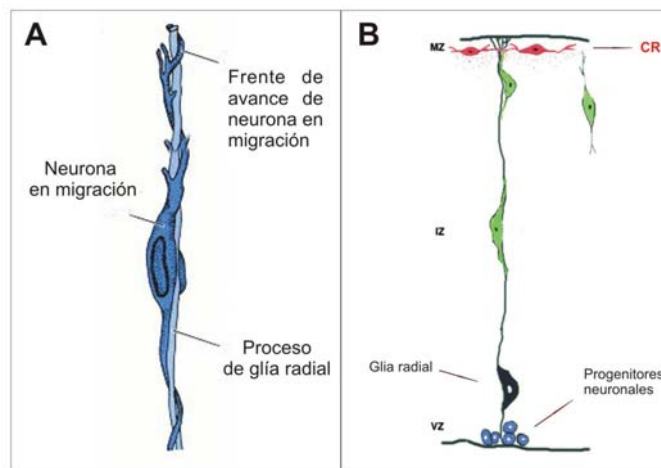


Figura 4. Migración radial en la corteza cerebral.

A) Representación esquemática de neurona en migración sobre sustrato de glía radial (*Adaptado de Gilbert, 2006*).

B) La proliferación de los progenitores de la zona ventricular origina células postmitóticas que se adhieren a la glía radial e inician el proceso de migración radial. Las neuronas migran unidas a la glía radial hasta llegar a su zona de destino; allí se detiene la migración y las neuronas se desadhieren de la glía y se diferencian en neuronas maduras. CR, células de Cajal-Retzius; MZ, zona marginal; IZ, zona intermedia; VZ, zona ventricular. *Adaptado de Dulabon et al., 2000*.

Una vez han finalizado su función de soporte físico en la migración, la glía radial retrae sus prolongaciones y se diferencia en astrocitos (Schmechel and Rakic, 1979). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la glía radial se puede comportar como células madres neurales capaces de generar neuroblastos en el epitelio neural (Malatesta et al., 2000; Malatesta et al., 2008).

Al llegar a la placa cortical, las células detienen su migración y se desadhieren de la glía radial para posicionarse en su estrato diana. Las neuronas se posicionan siguiendo un patrón o gradiente temporal de “dentro a fuera” (denominado en inglés *inside-out*, (Angevine and Sidman, 1961)). Esto implica que las neuronas que se originan de forma más temprana se posicionan en las capas más profundas mientras que las más tardías se localizan en posiciones más superficiales, por lo que han de atravesar las capas de células antiguas (Figura 5A). Este patrón también es utilizado por las neuronas

neuronas granulares del cerebelo (Gilthorpe et al., 2002; Komuro et al., 2001; Ryder and Cepko, 1994), neuronas del bulbo olfativo (Lois and Alvarez-Buylla, 1994) y células de Cajal-Retzius (Garcia-Moreno et al., 2007; Takiguchi-Hayashi et al., 2004). Pero sin duda, el ejemplo más estudiado es el de las interneuronas de la corteza cerebral (Anderson et al., 1997; de Carlos et al., 1996; Marin and Rubenstein, 2003; Martini et al., 2009; Yokota et al., 2007). A diferencia de las neuronas piramidales, generadas en la ZV de la propia corteza, las interneuronas llegan a ésta desde zonas no corticales muy alejadas, concretamente desde la *eminencia ganglionar medial* y la *eminencia ganglionar lateral* (Figura 5B). Aunque en roedores, la mayoría de interneuronas proceden de estas regiones, en primates y humanos existe una población procedente de zonas corticales (Jones, 2009; Letinic et al., 2002). Una vez las interneuronas han llegado a la corteza, se van posicionando mediante un patrón de “dentro a fuera”, de forma que neuronas piramidales e interneuronas de la misma edad se colocan en los mismos estratos independientemente de su lugar de origen (Cobas and Fairen, 1988; Fairen et al., 1986; Pla et al., 2006).

Diferenciación: neuritogénesis, guía axonal y sinaptogénesis. Dos factores definen el proceso de diferenciación en cada célula: el microambiente genético en el que la célula se generó y el ambiente molecular de su lugar de destino. La combinación de estos factores da lugar a la gran diversidad neuronal y glial a partir de un simple neuroepitelio. Una vez que la célula ha llegado a su destino, y también durante el proceso de migración, emitirá prolongaciones neuríticas que darán lugar a las dendritas y al axón. Además, el axón ha de crecer, a veces largas distancias, y encontrar su célula diana. Es un proceso conocido como **guía axonal**. Para ello, formará una estructura altamente especializada, denominada *cono de crecimiento axonal* (Figura 6), capaz de reconocer y dar respuesta a las señales moleculares presentes en el ambiente. Existen cuatro familias clásicas de moléculas de guía axonal, *Netrinas*, *Slits*, *Semaforinas* y *Efrinas*, además de morfógenos como *WNT*, *Sonic hedgehog* y *BMPs*, que generan respuestas de atracción o de repulsión del cono de crecimiento. Además, pueden actuar en forma de factores difusibles (señal de largo alcance) o mediante contacto, al estar presente en la matriz extracelular o en superficie de otras células (señal de corto alcance). Por tanto, los mecanismos resultantes de la acción de estas moléculas se pueden definir como: atracción por contacto, quimioatracción, repulsión por contacto y

quimiorrepulsión. Estos mecanismos actúan de forma simultánea y coordinada para dirigir el avance del cono de crecimiento hacia su diana (O'Donnell et al., 2009; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

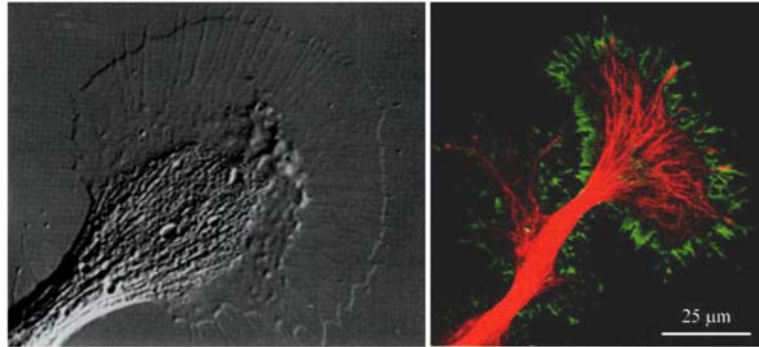


Figura 6. Microfotografía obtenida por microscopía electrónica de barrido que muestra un cono de crecimiento en el extremo del axón de una célula ganglionar sensorial (izquierda). A la derecha, se muestra un cono de crecimiento con sus haces de actina marcados en verde y sus microtúbulos en rojo. *Adaptado de Purves et al., 2001.*

La integración de las señales recibidas en el cono de crecimiento determina la respuesta del axón y es la base de la especificidad de las conexiones sinápticas. Los procesos de crecimiento y guía axonal son similares a los procesos de migración celular, siendo incluso las moléculas que participan en ambos procesos las mismas (Stoeckli and Zou, 2009; Zou and Lyuksyutova, 2007). Una vez los axones encuentran sus células diana, formarán contactos sinápticos con ellas, los cuales se estabilizarán o eliminarán en un proceso de refinamiento mayoritariamente dependiente de actividad neural. La diferenciación celular finalizará con la síntesis adecuada de neurotransmisores y receptores y la muerte celular de aquellas neuronas que no han recibido los contactos apropiados. Sin embargo, las sinapsis mantienen su capacidad de reconfigurarse tanto estructural como funcionalmente, incluso en estadios adultos. Esta propiedad se conoce como *plasticidad neural* y es la base de procesos de aprendizaje y memoria (Martin et al., 2000; Waites et al., 2005).

II. LA REGENERACIÓN AXONAL

El sistema nervioso tiene la habilidad de adaptarse y responder a diversos estímulos que van desde experiencias fisiológicas asociadas a memoria y aprendizaje hasta daños patológicos como lesiones traumáticas, isquemia o enfermedades neurodegenerativas (Yiu and He, 2006). Además de la plasticidad a nivel funcional, las respuestas del sistema nervioso también tienen lugar a nivel de reorganización estructural. Por ejemplo, estudios de imagen *in vivo* han mostrado que la experiencia sensorial puede dirigir la formación y eliminación de sinapsis, y que estos cambios están ligados al reajuste adaptativo de los circuitos neurales (Yuste and Bonhoeffer, 2001; Zito and Svoboda, 2002; Zuo et al., 2005). De forma similar, las lesiones neurales a menudo van acompañados de periodos transitorios de reestructuración anatómica con la formación de nuevos brotes axonales por parte de neuronas intactas, *sprouting* colateral, para mantener la funcionalidad del circuito (Devor and Govrin-Lippmann, 1979; Raisman, 1969). Uno de los ejemplos más conocidos es la reinervación aberrante que se produce en algunos síndromes epilépticos (ver apartado 4.4.a). Sin embargo, cuando se produce una lesión que secciona al axón (axotomía), la respuesta de éste es distinta dependiendo del lugar y del momento en el cual se produce. Cuando la lesión tiene lugar en estadios neonatales, tanto el SNC como el SNP, poseen la capacidad de regenerar sus axones. Pero conforme el individuo madura, se produce una disminución de esta capacidad en el SNC, siendo totalmente nula en estadios adultos. Por el contrario, el SNP sigue conservando esta característica en un grado importante durante toda la vida del organismo ((David and Lacroix, 2003; Horner and Gage, 2000) para revisión).

Esta diferencia en la respuesta axonal tras una lesión es debida a diversos factores, como veremos a continuación. Tras la axotomía, la parte del axón que se mantiene unida al cuerpo neuronal se denomina segmento proximal y la parte que queda separada se denomina segmento distal. Este segmento es el que más sufre tras la lesión, puesto que tanto el axón como las vainas de mielina que lo rodean y las células gliales que forman dichas vainas degeneran en un proceso denominado *degeneración walleriana* (Figura 7). Cuando la axotomía se produce en el SNP, los macrófagos invaden la zona para eliminar los fragmentos de mielina y las células de Schwann proliferan y se alinean longitudinalmente para proporcionar factores neurotróficos que promueven la regeneración del axón. Además, ciertos componentes de adhesión presentes en sus

membranas celulares y en la matriz extracelular también favorecen la extensión de los axones. Las neuronas dañadas reaccionan mediante la expresión de factores relacionados con el crecimiento, incluidos aquellos involucrados en la formación del cono de crecimiento axonal.

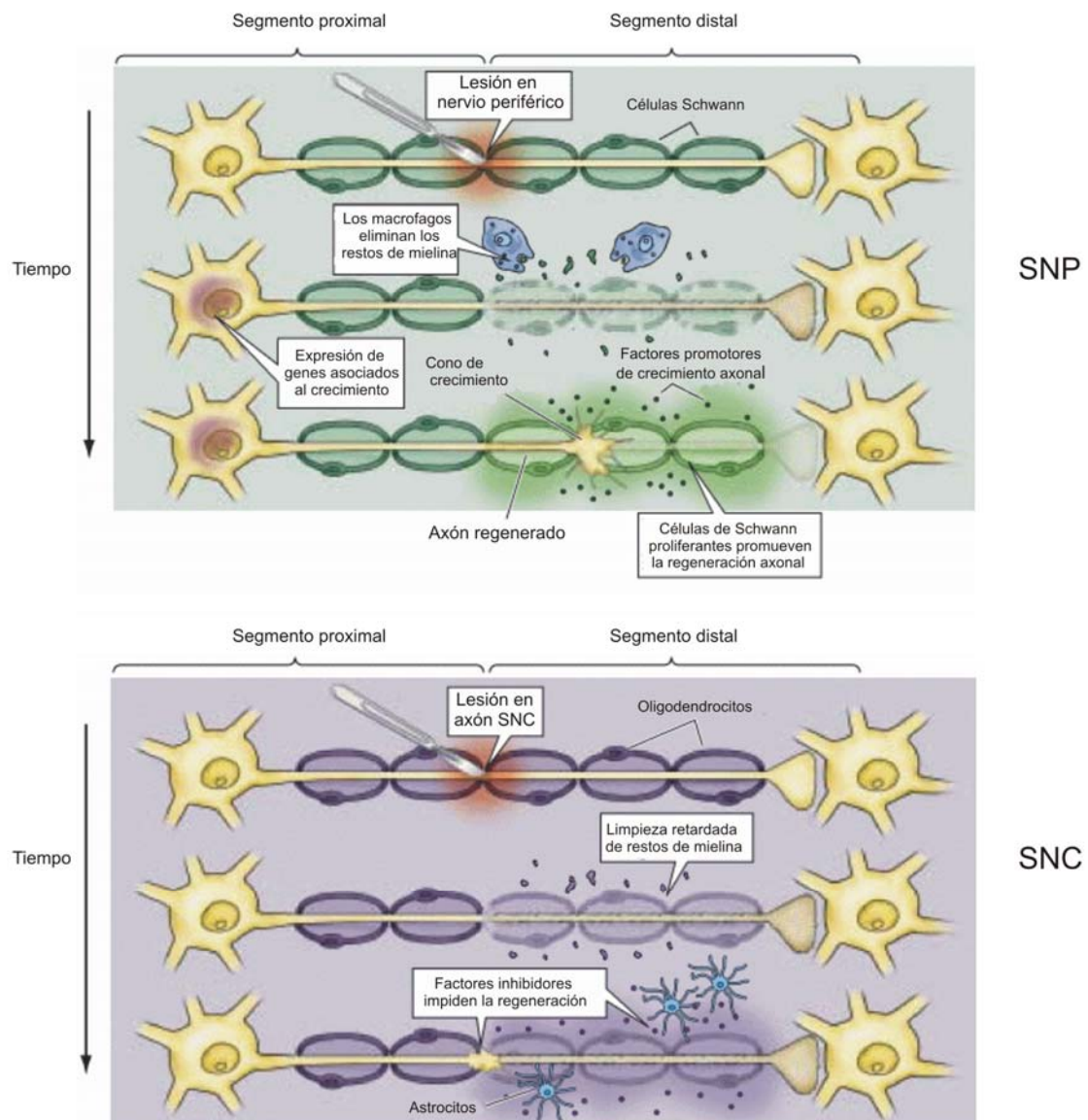


Figura 7. Diferentes respuestas a la lesión por axotomía en SNP (figura superior) y SNC (figura inferior). Adaptado de Purves et al., 2001.

Sin embargo, en el SNC, la eliminación de los restos de mielina es relativamente lenta y con la fragmentación de las vainas de mielina quedan expuestas determinadas moléculas

que producen un ambiente inhibitorio para el axón, por lo que éste sólo es capaz de desarrollar terminales distróficos incapaces de regenerar.

Aunque también existen factores intrínsecos, como la incapacidad de las neuronas adultas del SNC para reactivar su programa de crecimiento, son los factores extrínsecos, relacionados con la respuesta glial que se genera en la zona de lesión, la principal causa del fallo en la regeneración axonal.

2.1 Respuesta astrogial: cicatriz glial

La respuesta glial a una lesión da lugar al reclutamiento hacia la zona de lesión de una variedad de células gliales como microglía, precursores de oligodendrocitos y astrocitos, así como de fibroblastos procedentes de las meninges (Fawcett and Asher, 1999; Silver and Miller, 2004). La llegada de estas células tiene lugar a distintos tiempos postlesión y ocupan distintos compartimentos en la zona dañada. Además, el tipo celular que participa es dependiente de la naturaleza de la lesión, de su severidad y de su localización en el SNC (Fawcett and Asher, 1999; Pasterkamp and Verhaagen, 2001; Silver and Miller, 2004). Esta respuesta tiene efectos beneficiosos, ya que forma una cicatriz que sirve para aislar la zona de lesión, minimizar el área de inflamación y degeneración celular y reparar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, también tiene efectos muy negativos ya que producen una barrera física y un ambiente inhibitorio y restrictivo para la regeneración de los axones dañados (Silver and Miller, 2004; Sofroniew, 2009).

La cicatriz glial como barrera física. La respuesta glial a una lesión consiste mayoritariamente en la generación de astrocitos reactivos, hipertrofiados mediante la síntesis de filamentos intermedios como GFAP o vimentina. Se produce también cierta proliferación astrocítica, aunque es minoritaria y limitada a los alrededores de la zona de lesión. Los procesos membranosos que desarrollan los astrocitos hipertrofiados encapsulan la zona dañada y constituyen una barrera física que impide el crecimiento de los axones, aunque también puede evitar la entrada en la zona no dañada de células inflamatorias ((Sofroniew, 2009) para revisión). Sin embargo, se necesitan varios días, incluso semanas, para que la cicatriz se forme por completo, por lo que existen otros factores, principalmente moléculas inhibitorias, que limitan la regeneración axonal de forma previa a la formación de la cicatriz glial (Figura 8).

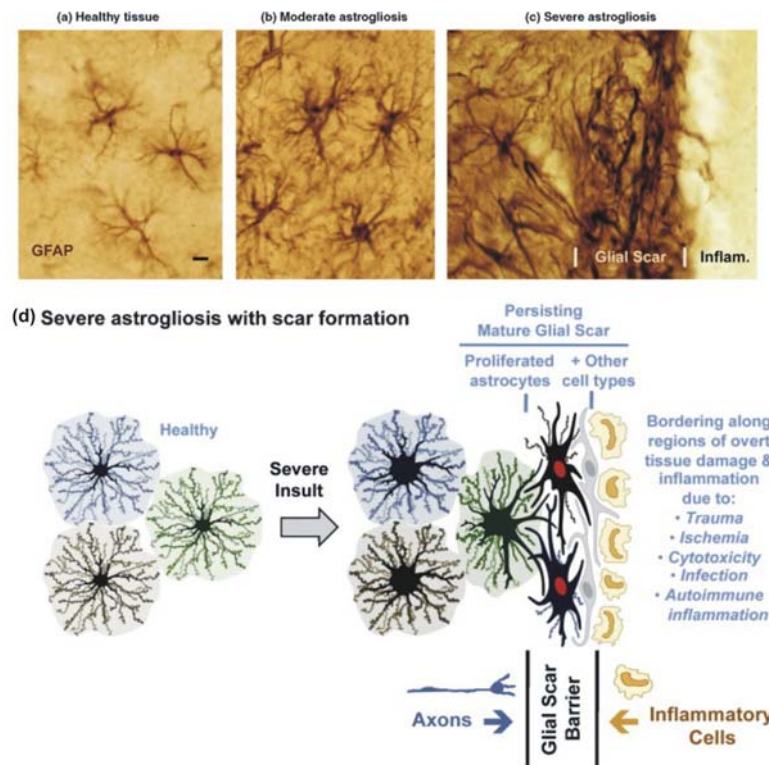


Figura 8. Formación de cicatriz glial en ratón tras lesión. **A)** Microfotografía de astrocitos (inmunoreactivos para GFAP) en tejido intacto, cuyos procesos celulares no se solapan entre sí. **B)** Astrogliosis reactiva moderada en respuesta a inyección intracerebral del antígeno bacteriano LPS (lipopolisacárido) **C)** Astrogliosis reactiva severa y formación de cicatriz glial (*Glial scar*) adyacente a la zona lesionada por traumatismo inflamación (Inflam). Hay que destacar el extenso solapamiento e interdigitaciones de los procesos celulares de los astrocitos reactivos. Escala: 8 μm . **D)** Representación esquemática de astrogliosis reactiva severa con formación de cicatriz glial que incluye astrocitos recién generados (con núcleo rojo) y otros tipos celulares (núcleos en gris) como fibroblastos meníngeos. La cicatriz glial actúa como una barrera para la regeneración axonal pero también impide la entrada de células inflamatorias que protege al tejido no dañado de la inflamación. *Adaptado de Sofroniew, 2009.*

La cicatriz glial como fuente de moléculas inhibitorias del crecimiento axonal. La astroglía reactiva produce determinadas moléculas, como proteoglicanos y moléculas de guía axonal y que tienen un efecto negativo en el crecimiento de axones formando parte del ambiente inhibitorio y no permisivo de la zona. Los **proteoglicanos** son glucoproteínas altamente glucosiladas que forman parte de la matriz extracelular y son sintetizadas por astrocitos reactivos, pero también por células meníngeas y oligodendrocitos (Pasterkamp and Verhaagen, 2001; Shearer et al., 2003; Silver and Miller, 2004). Los proteoglicanos consisten en un núcleo proteico al que se encuentran unidas covalentemente varias cadenas de glucosaminoglicanos (GAG), que en condiciones fisiológicas están cargados negativamente por la presencia de grupos sulfato o ácido urónico (D-glucurónico o L-idurónico). Están involucrados en numerosos procesos como crecimiento, adhesión, migración e interacción con otros

componentes de la matriz extracelular. Los astrocitos producen varios tipos de proteoglicanos con actividad inhibitoria, como Tenascina C (Meiners et al., 1995) y principalmente **proteoglicanos condroitin sulfato** (CSPG, del inglés *chondroitin sulfate proteoglycan*). La familia de CSPG consta de moléculas secretables (Neurocan, Fosfacan), moléculas ancladas a la membrana mediante un dominio GPI (Brevican) y moléculas transmembrana (NG2) (Kwok et al., 2008; Sandvig et al., 2004). Durante el desarrollo, los CSPG participan en la modulación de migración neuronal y guía axonal, en el crecimiento neurítico, tanto promoviendo como inhibiéndolo, y en la regulación de la polaridad neuronal (Bovolenta and Fernaud-Espinosa, 2000). Su efecto en el crecimiento neurítico depende del tipo celular con el que interactúan, de su concentración y de su interacción con otras moléculas (Bovolenta and Fernaud-Espinosa, 2000). En cultivo, los CSPG resultan extremadamente inhibitorios para axones embrionarios de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG), y actúan como potentes inhibidores de diversos promotores del crecimiento, como L1 o Fibronectina (Sandvig et al., 2004). En mamíferos adultos, y en distintos tipos de lesión del SNC, los CSPG son producidos y secretados por astroglia reactiva y oligodendrocitos rápidamente tras lesión (durante las primeras 24 horas) y persisten durante meses produciendo la inhibición axonal y la repulsión del cono de crecimiento. Gran parte del efecto repulsivo proviene de las cadenas GAG, ya que la actividad inhibitoria de los CSPG disminuye tras la aplicación de condroitinasa ABC, una enzima bacteriana que elimina las cadenas GAG (Kwok et al., 2008). Sin embargo, existen datos que sugieren que el núcleo proteico también puede provocar inhibición independiente de las cadenas GAG (Sandvig et al., 2004). Hasta el momento, el conocimiento acerca de los receptores y de la señalización intracelular que desencadenan los CSPG era escaso, aunque se ha implicado a la familia de enzimas GTPasas Rho en su señalización intracelular, puesto que la aplicación de inhibidores específicos de Rho o de Rock bloquean la inhibición de CSPG sobre axones de retina (Monnier et al., 2003). Sin embargo, recientemente se ha descubierto una molécula, PTP σ , capaz de revertir el efecto inhibitorio de CSPG sobre neuronas de DRG en cultivo (Shen et al., 2009).

Aunque los CSPG son las principales moléculas inhibitorias de la cicatriz glial, los astrocitos reactivos también generan **moléculas de guía axonal** como Efrinas y Slits (Sandvig et al., 2004). Se ha descrito la expresión de todos los miembros de la familia Slits y de su receptor en la zona de lesión en el SNC. De todos ellos, Slit2 muestra la

expresión más intensa, localizada en astrocitos reactivos que rodean el tejido necrótico, lo que sugiere que Slits podrían formar parte del ambiente inhibitorio creado en la zona lesionada (Hagino et al., 2003).

A pesar de este efecto negativo en una situación de lesión, los astrocitos también ejercen una función positiva, ya que proveen de soporte trófico y metabólico (nutrientes y factores de crecimiento como NGF, BDNF y NT3) a las neuronas supervivientes localizadas en los márgenes de la zona de lesión. Además proporcionan un sustrato favorable para la formación de nuevos capilares sanguíneos en la zona de lesión (Rolls et al., 2009).

2.2 Inhibidores derivados de células meníngeas

Cuando la lesión incluye la disrupción de la barrera hematoencefálica, los fibroblastos meníngeos se infiltran en el tejido nervioso dañado y sobreexpresan, al igual que los astrocitos reactivos, **moléculas de guía axonal** (Semaforinas, Slits o receptores de Efrinas), **CSPG** (NG2 y Fosfacan) y **proteoglicanos** (Tenascina C) (Rolls et al., 2009; Sandvig et al., 2004; Tang, 2003). En cuanto a las **Semaforinas**, se ha observado que estos fibroblastos sobreexpresan Semaforina 3A en lesiones del sistema olfativo, corteza cerebral y vía perforante, que al unirse a su receptor Neuropilina, sobreexpresado en los axones presentes en la zona de lesión, se produce el colapso del cono axonal (Pasterkamp et al., 1999; Pasterkamp and Giger, 2009). Las **Efrinas**, y sus receptores, conocidas por su implicación en migración celular y guía axonal durante el desarrollo, también son sobreexpresadas en la zona de lesión. Así, Efrina 2 y su receptor EphB2 se expresan en fibroblastos meníngeos y astrocitos reactivos respectivamente sugiriendo que estas moléculas pueden ser importantes en la formación de la cicatriz y en el reestablecimiento de la barrera hematoencefálica (Bundesen et al., 2003; Rolls et al., 2009; Sandvig et al., 2004).

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

2.3 Inhibidores derivados de oligodendrocitos/mielina

La hipótesis de una posible acción inhibitoria de la mielina del SNC sobre neuronas adultas lesionadas fue inicialmente planteada tras observar que neuronas disociadas eran capaces de regenerar en explantes de nervio ciático pero no sobre explantes de nervio óptico (Schwab and Thoenen, 1985). Posteriores estudios realizados por Schwab mostraron la primera evidencia de que la acción inhibitoria de la mielina residía en su composición, concretamente en dos fracciones proteicas de distinto peso molecular, 35 y 250 kDa, conocidas posteriormente como NI-35 y NI-250 (Caroni and Schwab, 1988b). Entre los diversos anticuerpos monoclonales que generaron contra estas fracciones, describieron que, IN-1, generado contra la fracción de 250 kDa, era capaz de bloquear su acción inhibitoria en diversos modelos de lesión (Caroni and Schwab, 1988a). El clonaje del epítipo reconocido por IN-1 llevó a la identificación, por parte de tres laboratorios independientes, de la primera molécula inhibidora asociada a mielina, la proteína **Nogo-A** (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; Prinjha et al., 2000). Posteriormente, se descubrieron otras moléculas con acción inhibitoria en el crecimiento neurítico como **MAG** (McKerracher et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 1994) y **OMgp** (Kottis et al., 2002; Wang et al., 2002b). Estas tres moléculas, Nogo-A, MAG y OMgp, descritas inicialmente en la membrana de los oligodendrocitos, se unen de forma independiente a un mismo complejo receptor, el **complejo “Nogo Receptor”**, formado por las proteínas **Nogo Receptor 1 (NgR1)**, **p75/TROY** (dependiendo del estadio de desarrollo y de la población neuronal) y **Lingo-1** (Fournier et al., 2001; Mi et al., 2004; Park et al., 2005; Shao et al., 2005; Wang et al., 2002a) (Figura 9). La unión al complejo estimula la interacción entre $p75^{NTR}$ y Rho-GDI, una proteína inhibidora de RhoA, secuestrándola e impidiendo así que inactive a RhoA. Al activarse RhoA, se activa su proteína efectora ROCK, que a su vez activa a la quinasa Lim que provoca la estabilización de citoesqueleto y por último el colapso axonal y la inhibición del crecimiento neurítico (He and Koprivica, 2004; Xie and Zheng, 2008). Como ya se ha mencionado, estas enzimas GTPasas Rho también participan en procesos de guía axonal mediados por Efrinas, Semaforinas y Netrinas.

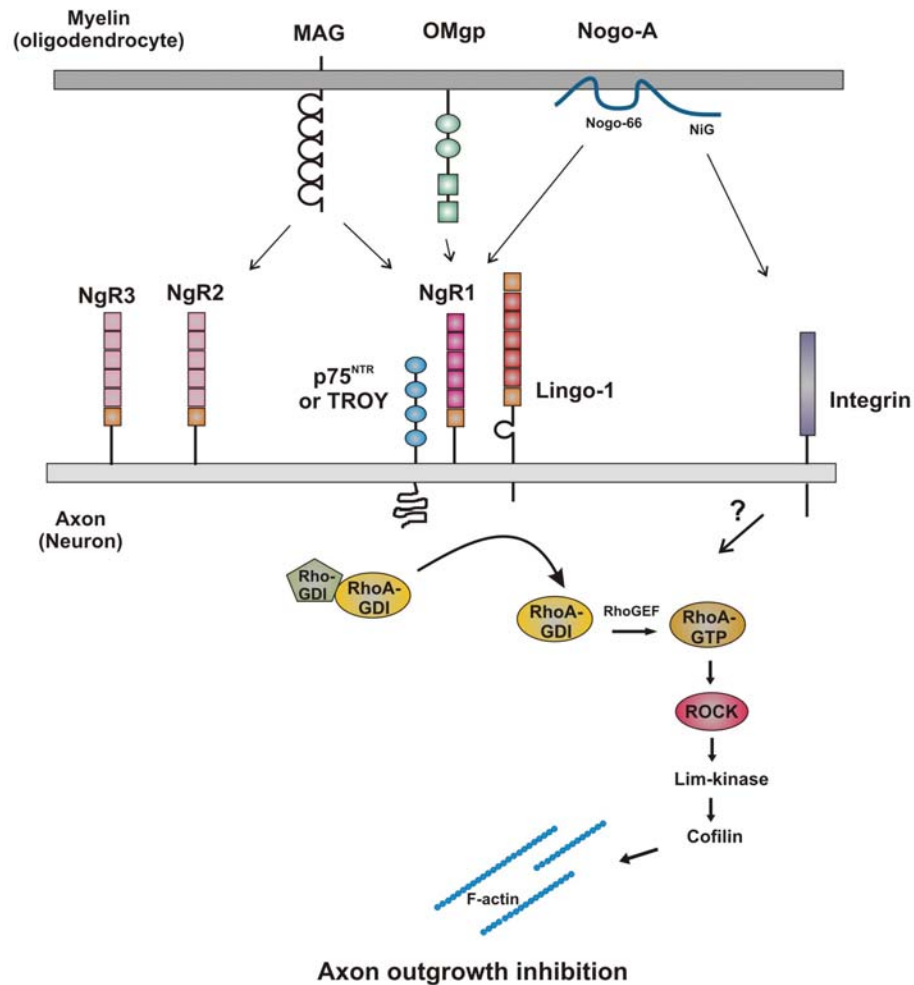


Figura 9. Inhibición de la regeneración axonal mediada por proteínas asociadas a mielina. Las proteínas Nogo-A, MAG y OMgp, presentes en la superficie de oligodendrocitos, se unen a NgR1, reclutando a p75/TROY y Lingo-1 para formar el complejo receptor y transducir la señal inhibitoria al interior de la neurona. MAG también se une a NgR2, aunque no se conocen sus correceptores. En la neurona, el complejo Nogo receptor estimula la formación de RhoA-GTP, lo que conlleva la inhibición del crecimiento neurítico. *Adaptado de Xie y Zheng, 2008.*

Existen diversos estudios que muestran que Nogo-A, NgR1 y MAG son regulados tras lesión (Hunt et al., 2002b; Mingorance et al., 2004). Puesto que esta regulación se produce de forma rápida, y previa a la formación de la cicatriz glial, las MAIPs (proteínas inhibitorias asociadas a mielina) representarían uno de los principales inhibidores de la regeneración, por lo que su bloqueo contribuiría a promover la regeneración axonal.

Aunque las MAIPs representan el mayor componente inhibitorio presente en la mielina, se han encontrado otras moléculas expresadas por oligodendrocitos, como **Semafarina 4D/CD100** y **Efrina B3**, que también parecen participar en procesos inhibitorios. Efrina

B3 funciona como repelente en la línea media durante la formación del tracto cortico-espinal (Kullander et al., 2001), pero continúa expresándose durante estadios postnatales en oligodendrocitos mielinizantes (Benson et al., 2005). Semaforina 4D/CD100 se expresa también en oligodendrocitos mielinizantes, y su expresión es inducida por lesión causando colapso axonal (Moreau-Fauvarque et al., 2003). Por tanto, aunque la mayoría de moléculas de guía axonal implicadas en estadios tempranos de desarrollo disminuyen su expresión cuando el desarrollo se ha completado, algunas persisten hasta la edad adulta para ejercer un efecto inhibitorio en el SNC maduro.

Otros inhibidores derivados de los oligodendrocitos son CSPG como, por ejemplo, **Brevican** y las variantes V2 y V3 de **Versican**, y el proteoglicano **Tenascina R**, cuya expresión se ve incrementada en la zona de lesión. Al igual que MAG, Tenascina R es una molécula bifuncional, ejerciendo adhesión y antiadhesión neurítica, por lo que promueve e inhibe el crecimiento axonal respectivamente (Busch and Silver, 2007; Sandvig et al., 2004).

2.4 Inhibición glial en la evolución

De los estudios anteriores se puede concluir que una única molécula no es responsable del fallo en la regeneración axonal en el SNC adulto, como tampoco se puede excluir la existencia de otras moléculas clave que aún no hayan sido identificadas. Dada la marcada diversidad entre los inhibidores derivados de células gliales, es difícil establecer sus respectivas contribuciones al bloqueo de la regeneración y, la eliminación de componentes de forma individualizada puede producir falta de regeneración debido a mecanismos compensatorios desarrollados por otros inhibidores. Por ello, las terapias encaminadas a promover la regeneración deberían incluir combinaciones de tratamientos que abarquen las distintas vías de señalización implicadas.

Además, estos datos apoyan un modelo en el cual distintos factores inhibitorios derivados de células gliales han evolucionado para promover la maduración y la estabilización de la compleja circuitería neural de vertebrados superiores (Figura 10). Durante el desarrollo, los axones embrionarios están sin mielinizar y responden a diversas moléculas de guía axonal como Netrinas, Efrinas, Slits y Semaforinas para establecer y refinar los circuitos neurales. Conforme el SNC madura, los

oligodendrocitos envuelven a los axones para facilitar la transmisión sináptica, pero también para impedir la formación de rebrotes axonales (*sprouting*) aberrantes, mientras que los astrocitos expresan CSPG y así limitar también cambios estructurales en el adulto que pudieran desestabilizar el sistema. Por tanto, la expresión de estas moléculas inhibitorias en el adulto, más allá de impedir la regeneración axonal en un contexto de lesión, estarían actuando como un mecanismo protector para preservar las complejas redes neurales formadas durante el desarrollo (Yiu and He, 2006).

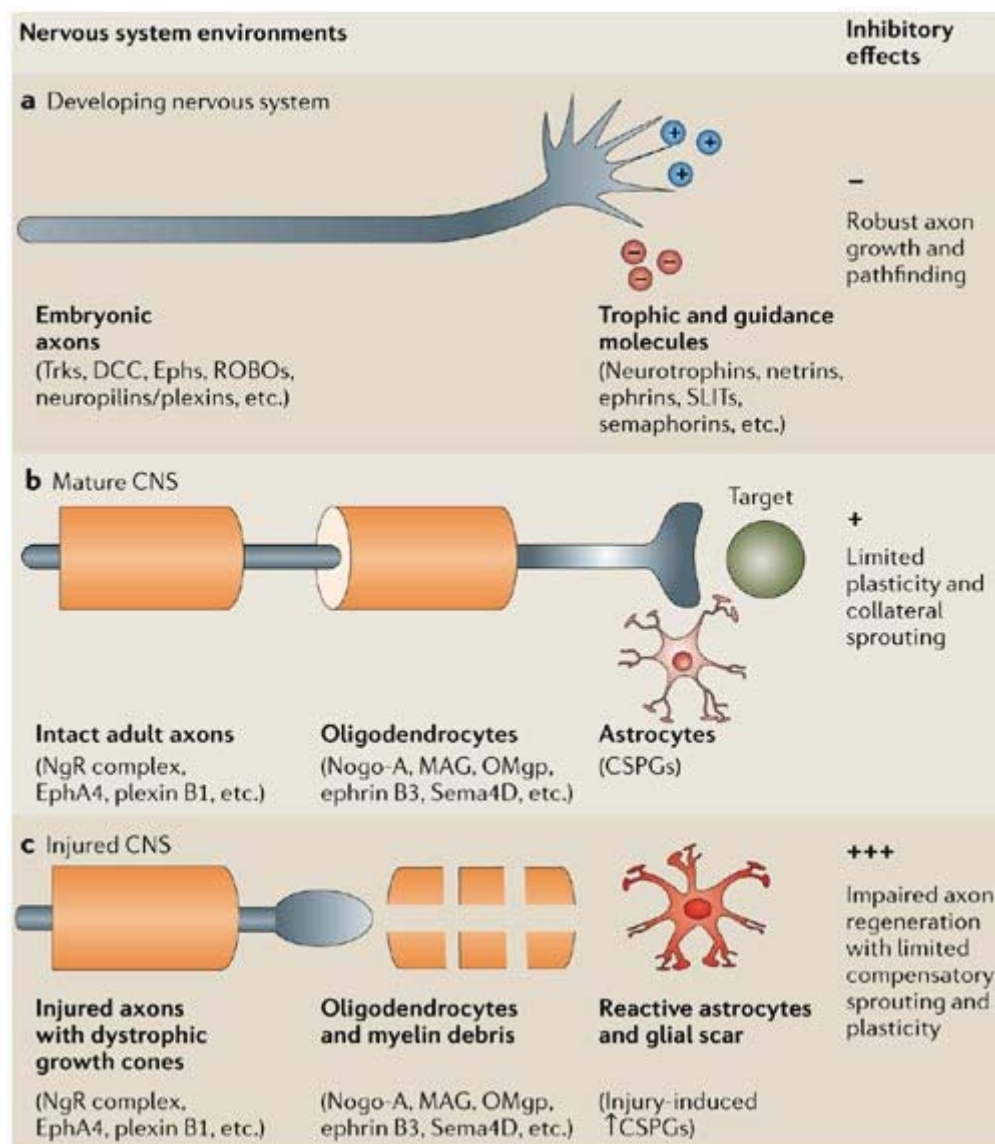


Figura 10. A) Durante el desarrollo embrionario, los axones no mielinizados con conos de crecimiento pueden extender, retraerse y responder a diversos factores tróficos y moléculas de guía. Este proceso dinámico permite el refinamiento de los circuitos neurales. B) Conforme el sistema nervioso madura tras el nacimiento, los oligodendrocitos mielinizan los axones para prevenir el *sprouting* aberrante y los astrocitos secretan CSPG para limitar la plasticidad estructural en el adulto. C) Tras una lesión por axotomía en el SNC, los astrocitos reactivos sobreexpresan CSPG. La parte distal del axón seccionado forma conos de crecimiento distróficos que son expuestos a CSPG de la cicatriz glial y a proteínas inhibitorias derivadas de mielina. El bloqueo de estos inhibidores no consigue la regeneración completa de los axones sino sólo promueve cierto *sprouting* compensatorio. Adaptado de Yiu y He, 2006.

III. PROTEÍNAS ASOCIADOS A MIELINA: FUNCIONES NO RELACIONADAS CON REGENERACIÓN

Aunque clásicamente se ha estudiado el papel de estas proteínas en una situación patológica, se ha demostrado, como veremos a continuación, que también ejercen otras funciones no relacionadas con la inhibición de la regeneración axonal.

3.1 Nogo-A

Anteriormente, se han mencionado los experimentos realizados por Caroni y Schwab que condujeron a la identificación de moléculas con actividad inhibitoria para el crecimiento axonal en dos fracciones proteicas de la mielina procedente del SNC (Caroni and Schwab, 1988b). Estas fracciones fueron originalmente llamadas, **NI-250** y **NI-35** (del inglés *neurite growth inhibitor* y un número correspondiente a su peso molecular). Generaron un anticuerpo monoclonal, IN-1 (del inglés *inhibition neutralization*) contra la fracción de 250 kDa, capaz de bloquear su acción inhibitoria (Caroni and Schwab, 1988a), y dado que IN-1 también era capaz de neutralizar la actividad inhibitoria de NI-35, se asumió que esta fracción era un producto proteolítico de NI-250 (Bandtlow and Schwab, 2000). Se observó que IN-1 promovía el *sprouting* colateral *in vivo* en diversos modelos de lesión aunque no se obtuvo una regeneración funcional completa (Bregman et al., 1995; Schnell and Schwab, 1990; Thallmair et al., 1998). Sin embargo, la identidad del antígeno no se conoció hasta que fue identificado por tres grupos independientes como **Nogo-A** (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; Prinjha et al., 2000).

Nogo-A es el transcrito de mayor tamaño del gen *nogo* (también conocido como RTN4). Este gen codifica putativamente para siete proteínas por corte y empalme (*splicing*) alternativo y diferente uso de promotores, aunque sólo tres son finalmente transcritas en el SNC: Nogo-A, Nogo-B y Nogo-C (Hunt et al., 2002a; Oertle and Schwab, 2003). Pertenecen a una familia de proteínas que se localizan en el retículo endoplasmático (RE), por lo que reciben el nombre de **familia Reticulon (RTN)**. Las proteínas RTN se expresan de forma ubicua en vertebrados y han sido descritas en diversos taxones eucarióticos, pero no en procariontes (Oertle and Schwab, 2003). Los cuatro genes RTN de mamíferos (RTN1, RTN2, RTN3 y RTN4/Nogo), comparten una estructura génica similar y dan lugar a diferentes transcritos alternativos (Figura 11A).

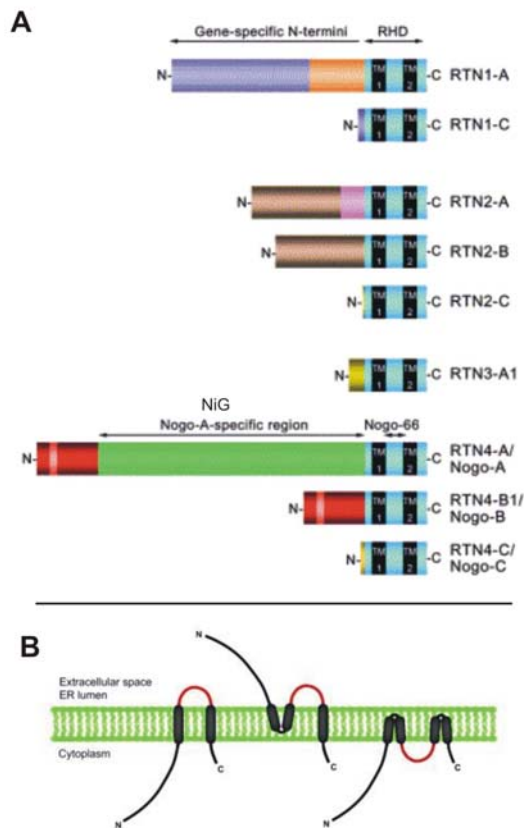


Figura 11. Estructura y topología de membrana de la familia Reticulon (RTN).

A) Los nueve transcritos de los cuatro genes reticulon de mamíferos. La región C-terminal contiene el dominio conservado RHD, mientras que la región N-terminal es específica de cada parólogo y no muestra homología de secuencia con las otras proteínas. La región Nogo-66, situada entre los dos dominios transmembrana (TM), y la región NiG, específica de Nogo-A, son responsables de la inhibición del crecimiento neurítico. (*Adaptado de Oertle y Schwab, 2003*).

B) Posibles topologías de membrana de las proteínas RTN. Las diferentes topologías y localización subcelular (RE o membrana plasmática) puede permitir que los RTN desempeñen diversas funciones en la célula. (*Adaptado de Yang y Strittmatter, 2007*).

La región N-terminal es muy divergente entre los diferentes RTN y muestran poca o ninguna similitud de secuencia entre ellos (Yang and Strittmatter, 2007). Sin embargo, todos comparten una región C-terminal muy conservada conocida como **dominio RHD** (del inglés *reticulon-homology domain*). Éste consiste en dos regiones hidrofóbicas, de 28 a 36 aminoácidos cada una, que flanquean una región hidrofílica de 60-70 aminoácidos, seguido de una cola C-terminal de 50 aminoácidos. El lazo o *loop* hidrofílico de la región RHD ha sido detectado tanto en la superficie celular como intracelularmente, por lo que se ha sugerido que los dominios hidrofóbicos pueden cruzar completamente la membrana plasmática o de RE o doblarse para formar una horquilla (Figura 11B). De esta manera, las proteínas RTN pueden presentar diferentes topologías en la membrana celular o de RE, e incluso diferentes topologías dependiendo del tipo

celular en el cual se expresen, lo que les confiere la capacidad de desempeñar funciones muy diversas (Yang and Strittmatter, 2007). Entre éstas destaca el papel que desempeñan en morfogénesis y estabilización del RE, en el tráfico de material desde el RE hasta otros compartimentos membranosos (complejo de Golgi, endosomas, vesículas sinápticas y membrana plasmática) y también en apoptosis (Iwahashi et al., 2002; Li et al., 2001; Oertle and Schwab, 2003; Tagami et al., 2000). Sin embargo, células carentes de estas proteínas no presentan defectos importantes en la estructura endosomal o de RE.

La **acción inhibitoria de Nogo-A** en el crecimiento neurítico está mediada al menos por dos dominios: **NiG**, la región específica de Nogo-A, y **Nogo-66**, la región de 66 aminoácidos flanqueada por las dos regiones transmembrana (Figura 11B). Puesto que esta región está presente en las tres isoformas, Nogo-A,-B y-C, las tres isoformas de Nogo tienen potencialmente propiedades inhibitorias para el crecimiento axonal. El dominio Nogo-66 inhibe el crecimiento axonal mediante la unión a NgR1 mientras que el dominio NiG, lo hace mediante su unión a integrinas (Hu and Strittmatter, 2008) (ver Figura 9, apartado 2.3). Recientemente, se ha caracterizado un tercer dominio inhibitorio, localizado en la región N-terminal común para Nogo-A/B que puede inhibir la dispersión de células 3T3, pero que carece de efecto en neuronas (Oertle et al., 2003). Por tanto, la investigación actual se centra en la caracterización de los mecanismos que implican la actividad de Nogo-66 y NiG, aunque Nogo-66 parece tener mayor poder inhibitorio en ensayos de colapso axonal y su efecto es más específico de neuronas (Fournier et al., 2001).

Nogo-A se expresa principalmente en el SNC, pero también en testículos y corazón a niveles más bajos. Nogo-B tiene una amplia distribución, tanto en SNC como en SNP, y Nogo-C se expresa fundamentalmente en músculo esquelético, aunque también en cerebro y corazón (Huber et al., 2002). A nivel celular, Nogo-A se expresa en oligodendrocitos del SNC, pero no en células de Schwann del SNP (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000). Pero, además también se ha encontrado Nogo-A en diversos tipos neuronales del sistema nervioso adulto y en desarrollo (Mingorance et al., 2004; Tozaki et al., 2002). Por ejemplo, se ha descrito la presencia de Nogo-A en neuronas adultas de médula espinal, de ganglios de la raíz dorsal (DRG), hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, núcleo de habénula, corteza piriforme, núcleo rojo, núcleo oculomotor y núcleo trigeminal pontino (Huber et al., 2002; Hunt et al., 2002b; Josephson et al., 2001). Su patrón de expresión aumenta desde estadios embrionarios hasta estadios adultos (Mingorance et al., 2004). Además, se ha descrito que se expresa en zonas presinápticas y postsinápticas (Aloy et al., 2006; Lee et al., 2008). La expresión de Nogo-A en otros tejidos y, en particular en neuronas, y la amplia distribución de las isoformas Nogo-B y Nogo-C, sugieren que la familia de proteínas Nogo debe tener funciones adicionales a la de inhibición del crecimiento axonal. Por otro lado, aunque los astrocitos no presenten Nogo-A durante el desarrollo ni en

estadios adultos en condiciones normales, sí que son capaces de expresarlo, transitoriamente, después de una lesión mecánica (Mingorance et al., 2004).

A nivel subcelular, se han propuesto dos topologías principales de Nogo-A, aunque no se pueden descartar otros tipos. En la primera, los dominios con función inhibitoria estarían localizados extracelularmente o en el lumen del RE, mientras que en la segunda topología sólo el dominio loop66 sería extracelular (Figura 11B). La localización exacta de Nogo-A en la superficie celular tiene un gran significado biológico. Cuando Nogo-A está presente en la superficie de oligodendrocitos del SNC adulto inhibe el crecimiento neurítico y la regeneración mediante la exposición extracelular de sus dominios inhibitorios (Dodd et al., 2005; Oertle et al., 2003). Sin embargo, una gran cantidad de Nogo-A intracelular está asociado a RE y complejo de Golgi, por lo que puede desempeñar una función diferente a la anterior (Oertle et al., 2003). Como se ha comentado anteriormente, Nogo-A también se expresa en neuronas y fibroblastos, tanto en RE como en superficie celular, lo que apunta la posibilidad de que pueda ejercer diferentes funciones según el tipo celular en el que se exprese y su localización subcelular (Dodd et al., 2005; Oertle et al., 2003).

Función de Nogo-A en neuritogénesis y migración neuronal durante el desarrollo

La capacidad neuronal de respuesta a Nogo-A parece depender del estadio de desarrollo (Cai et al., 2001; Mingorance et al., 2004). Así, en estadios embrionarios las neuronas de DRG de rata y células ganglionares de retina de pollo son poco sensibles a Nogo-A, pero en estadios adultos sufren colapso e incrementan sus niveles intracelulares de calcio cuando son expuestos al inhibidor. Estos experimentos muestran que la sensibilidad neuronal a Nogo-A es adquirida alrededor del momento de la mielinización, lo que parece indicar que Nogo-A tiene otras funciones en el desarrollo no relacionadas con la inhibición axonal.

Durante el desarrollo, Nogo-A se expresa en la mayoría de poblaciones neuronales, incluyendo las que se encuentran en estadios de proliferación y migración (Josephson et al., 2001; Mingorance et al., 2004; Tozaki et al., 2002). Además, su expresión esta particularmente enriquecida en tractos axonales telencefálicos (Tozaki et al., 2002). Esta presencia de Nogo-A en neuronas, previa a la expresión de NgR1, es lo que refuerza la idea de que ejerce otras funciones, posiblemente relacionadas con la formación de tractos axonales y de crecimiento neurítico (Hunt et al., 2002b; Mingorance et al., 2004; Tozaki et al., 2002). Richard y colaboradores observaron que Nogo-A se acumulaba en

conos de crecimiento axonal y en puntos de ramificación axonal en el sistema olfativo de rata en desarrollo, con una distribución similar a la de las proteínas asociadas a microtúbulos. Además, vieron que Nogo-A se expresaba transitoriamente en procesos dendríticos en el bulbo olfativo postnatal, lo que sugería que podía estar involucrado en procesos de crecimiento axonal y modelado dendrítico a través de la regulación de la dinámica de microtúbulos (Richard et al., 2005). Otros estudios también han sugerido una relación de Nogo-A con procesos de neuritogénesis al encontrar que Nogo-A está presente en dendritas de células de Purkinje en procesos *sprouting* (Huber et al., 2002) y que su sobreexpresión en células COS conlleva la formación de procesos similares a neuritas (Voeltz et al., 2006). Sin embargo, otros estudios demuestran que Nogo-A neuronal puede restringir el crecimiento neurítico a través de la modulación negativa del cono de crecimiento (Mingorance-Le Meur et al., 2007; Montani et al., 2009). En línea con estos resultados, se ha demostrado que Nogo-A puede inhibir *in vitro* el crecimiento neurítico inducido por la proteína netrin (Liu et al., 2009).

En estudios realizados en nuestro grupo durante el desarrollo embrionario de la corteza cerebral de ratón se observó que Nogo-A era expresado por glía radial a lo largo del periodo de corticogénesis, por neuronas corticales postmitóticas y también por neuronas GABAérgicas que migraban tangencialmente desde las eminencias ganglionares. Además, se observó que el mutante para Nogo-A presentaba alteraciones en la migración de cohortes tempranas de neuronas GABAérgicas, lo que sugería que Nogo-A podría desempeñar diversas funciones durante el desarrollo de la corteza cerebral, como la modulación de la migración tangencial, formación neurítica y maduración neuronal, lo que refleja una función de Nogo-A específica de tipo celular (Mingorance-Le Meur et al., 2007). También se ha identificado que Nogo-A neuronal interacciona con la proteína GPR50, relacionada con desórdenes mentales, y que ambas colocalizan en espinas sinápticas. Además, en contraposición a Nogo-A, la sobreexpresión de GPR50 conlleva a un aumento en la longitud neurítica y en la formación de estructuras similares a filopodios y lamelipodios (Grunewald et al., 2009).

Recientemente, Wang ha descrito que Nogo-A es expresado por la glía radial de la línea media del quiasma óptico y que está involucrado en el direccionamiento de los axones en el quiasma óptico del embrión de ratón (Wang et al., 2008b; Wang et al., 2008c).

En otro estudio se observó que la proteína Nogo-66 recombinante promovía la adhesión de células de glía envolvente olfativa y que inhibía su migración. Estos efectos se

producían mediante la activación de RhoA por NgR1, el cual está presente en estas células (Su et al., 2007).

Función de Nogo-A en la unión axoglial

En el inicio de la mielinización, Nogo-A se localiza específicamente en la región paranodal de la vaina de mielina, que es la zona que flanquea los nodos de Ranvier y donde el oligodendrocito y la neurona establecen un contacto más estrecho (Nie et al., 2003) (Figura 12).

Durante este periodo, el *loop* Nogo-66 es expuesto en los paranodos e interacciona con el complejo Caspr/F3 presente en la superficie neuronal. Esta unión da lugar a un desplazamiento de los canales de potasio desde el nodo al yuxtaparano, proceso necesario para permitir la conducción saltatoria. Es posible que finalizado el periodo de mielinización, la distribución de Nogo-A varíe e interaccione preferentemente con NgR1.

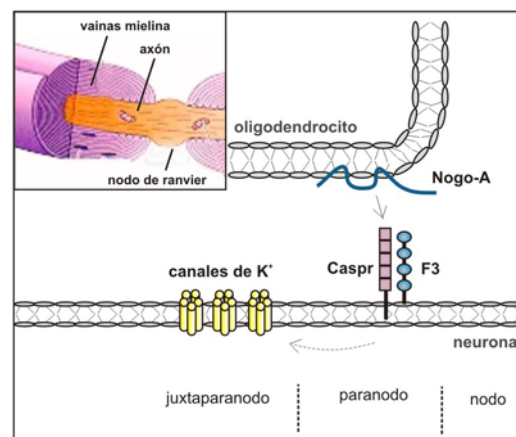


Figura 12. Función de Nogo-A en la unión axoglial. Nogo-A se localiza en la mielina, en la región correspondiente a los paranodos e interacciona con el complejo Caspr/F3 de la neurona. Adaptado de Mingorance et al., 2004b.

Funciones intracelulares de Nogo-A

Debido a su localización en el RE, Nogo-A puede desempeñar diversas funciones intracelulares tanto en oligodendrocitos como en neuronas. Aunque no existen evidencias claras de estas funciones de Nogo-A, es razonable pensar que la gran cantidad de Nogo-A retenido en RE (tan sólo el 1% está presente en superficie celular) pueda ejercer alguna función, probablemente relacionada con aquellas ejercidas por las proteínas RTN. Por ejemplo, se conoce que RTN1-C y Nogo-B ejercen funciones proapoptóticas, al desplazar a Bcl-2 y Bcl-x_L desde la mitocondria al RE, impidiendo así sus funciones antiapoptóticas (Li et al., 2001; Oertle and Schwab, 2003; Tagami et al., 2000; Watari and Yutsudo, 2003). Asimismo, Nogo-C también parece estar implicado en mecanismos apoptóticos dado que su sobreexpresión en células HEK293 induce apoptosis mediante un mecanismo dependiente de la vía JNK-c-Jun (Chen et al., 2006b). Dado que Nogo-A contiene la secuencia completa de Nogo-B, es muy probable

que pueda regular también el proceso apoptótico. Aunque con cierta controversia, se ha descrito que Nogo-A interacciona con una proteína mitocondrial de función desconocida, NIMP (del inglés *Nogo Interacting Mitochondrial Protein*) (Hu et al., 2002). Dado el relevante papel que ejerce la mitocondria en el proceso apoptótico, la interacción con NIMP representaría un segundo indicio, junto con la homología con Nogo-B, que relacionaría a Nogo-A con el control apoptótico. Otras proteínas capaces de interactuar con Nogo-A son la tubulina y MBP, aunque se desconoce el papel que estas interacciones puedan desempeñar (Taketomi et al., 2002). Por otra parte, algunos miembros de la familia RTN estabilizan el RE, regulan el tráfico entre distintos compartimentos membranosos e incluso interaccionan con las proteínas SNARE (Oertle and Schwab, 2003; Steiner et al., 2004). Debido al alto grado de homología de las proteínas RTN, no podemos descartar que Nogo-A pueda ejercer funciones similares. De momento, se ha identificado que Nogo-A es necesario para la formación y estabilización de la red de RE en *Xenopus* (Voeltz et al., 2006).

Por último, los miembros RTN1 pueden formar homómeros y heterómeros pudiendo actuar como poros o complejos transportadores (Oertle and Schwab, 2003). Se ha descrito que Nogo-A, Nogo-B and Nogo-C pueden formar complejos (aunque Nogo-A no interacciona consigo mismo) cuando son sobreexpresados y también de forma endógena en oligodendrocitos (Dodd et al., 2005)(Mingorance-LeMeur, tesis doctoral). Estos complejos de proteínas podrían actuar como canales iónicos, poros o transportadores y, dado que Nogo-A y Nogo-B tienen un sitio putativo de unión a calcio en su región N-terminal, el complejo Nogo-A/B/C podría ser un canal o transportador regulador de calcio en RE, en otro orgánulo intracelular o incluso en membrana plasmática (Dodd et al., 2005).

Otras proteínas descritas recientemente como proteína que interaccionan con Nogo-A son la fosfodiesterasa CNP (del inglés 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) específica de oligodendrocitos (Sumiyoshi et al., 2009) y la ubiquitina ligasa WWP1 (Qin et al., 2008), lo que amplía el espectro de posibles funciones para Nogo-A.

Función de Nogo-A en diferenciación neural

Las células progenitoras neurales pueden diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, por lo que se les ha considerado como una posible herramienta en terapias regenerativas del SNC. Sin embargo, cuando estos progenitores son transplantados en la médula espinal, mayoritariamente se diferencian en células gliales y

no en neuronas. Recientemente, se ha descrito que Nogo-A es capaz de inhibir la diferenciación neuronal de estos progenitores neurales y promover su diferenciación en células astrogiales a través de la vía NgR1 y mTOR-Stat3, pero sin implicar la activación de la vía de la quinasa RhoA (Wang et al., 2008a).

Además, se ha visto que Nogo-A/B y NgR1 se expresan en la superficie de células madre embrionarias y blastocistos de ratón y que la activación de NgR1 por Nogo-66 inhibe la diferenciación de estas células en las tres líneas germinales mediante la vía de señalización de Stat3. Por tanto, las proteínas Nogo y NgR1 podrían estar implicadas en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre embrionarias y en el desarrollo temprano del embrión (Gao et al., 2009).

Otra evidencia que sitúa a Nogo-A en un contexto de diferenciación neural es el estudio realizado por Caltharp en embriones de pollo, en el que muestran que la inducción de la expresión de Nogo-A coincide con la formación de la placa neural y que la expresión de Nogo-A, inducida por FGF, persiste en estructuras derivadas del neuroectodermo (Caltharp et al., 2007).

3.2 MAG

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

MAG es miembro de la superfamilia de las Inmunoglobulinas. Dentro de esta superfamilia, se puede distinguir el grupo de las Ig CAMs (*Inmunoglobulines Cell Adhesion Molecules*), formada entre otros por MAG, NCAM, L1, TAG-1 y DCC (Figura 13). Este grupo se expresa ampliamente durante el desarrollo y juega un papel importante en el desarrollo axonal (Walsh and Doherty, 1997). Existen dos isoformas de MAG, generadas por *splicing* alternativo, S-MAG y L-MAG, que aparecen con un peso molecular de 67 y 71 kDa respectivamente, tras ser desglucosiladas. Ambas moléculas comparten la región N-terminal formada por 5 dominios Ig extracelulares y un dominio

transmembrana, pero difieren en su dominio intracelular. La isoforma L-MAG es la predominante durante el desarrollo, mientras que en el adulto predomina S-MAG (Pedraza et al., 1991; Tropak et al., 1988).

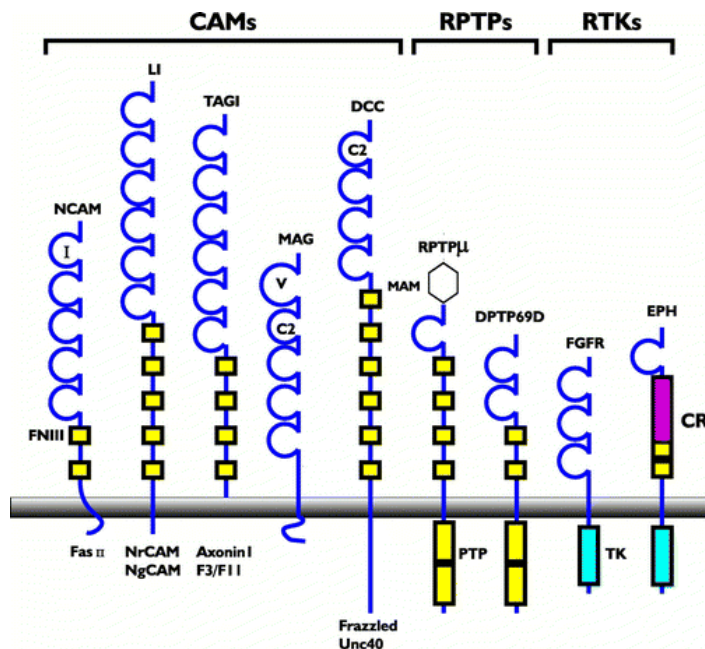


Figura 13. Estructura de algunos miembros de la superfamilia Ig implicadas en crecimiento y guía axonal en el sistema nervioso.

Los tres principales subgrupos son: Ig CAM, RPTP y RTK. Todas las moléculas contienen dominios Ig, del tipo C2, V o I, y repeticiones fibronectina tipo III (FNIII), a excepción de MAG. PTP y TK son dominios intracelulares catalíticos. CR es dominio rico en Cisteínas.

Adaptado de Walsh y Doherty, 1997.

Función de MAG en mielinización

Se ha sugerido que MAG ejerce un papel clave en los estadios iniciales de la mielinización y en el mantenimiento de las vainas de mielina, especialmente en el SNP (Schachner and Bartsch, 2000). Los ratones deficientes para MAG muestran un retraso en la formación de la mielina compacta y degeneración en los procesos distales de los oligodendrocitos (ver (Quarles, 2009) para revisión). Sin embargo, estas diferencias no son tan graves como cabría esperar, por lo que se ha sugerido que otras moléculas estarían actuando de forma compensatoria en estos animales.

Función de MAG en adhesión intercelular: unión axo-glial

Después de la formación de la mielina, la localización de MAG se restringe a la región periaxonal, en contacto con los axones mielinizados, y está especialmente enriquecida en la región paranodal de las vainas de mielina. Debido a esta localización se ha propuesto que MAG participa en la estabilización de los contactos entre los axones y los

procesos gliales, siendo necesaria para el mantenimiento y supervivencia de algunos axones ya que los ratones deficientes muestran atrofia axonal (Quarles, 2009). Sin embargo, se desconocen los receptores que pueden mediar esta señalización.

Función de MAG en crecimiento neurítico

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

3.3 OMgp

OMgp (del inglés *Oligodendrocyte Myelin glycoprotein*) es la proteína menos conocida de los tres inhibidores asociados a mielina, a pesar de que fue la primera en ser descrita (Mikol and Stefansson, 1988). Fue identificada en extractos de sustancia blanca humana y cultivos de oligodendrocitos de oveja y recibe su nombre por su localización específica en la mielina del SNC (aunque más tarde se observó que también era expresada en neuronas). La proteína madura consiste en un polipéptido de 401 aminoácidos (aunque la forma inmadura consta de 440), distribuidos en 4 dominios: un dominio N-terminal rico en residuos Cisteína, seguido de un dominio rico en residuos de Leucina (LRR), un dominio rico en residuos Serina-Treonina (S/TR) y un grupo glucosilfosfatidil inositol (GPI) por el cual se ancla a membrana plasmática (Mikol et al., 1990b) (Figura 14A). El dominio más importante para su función es el dominio LRR, que consiste en 8 repeticiones en tándem de residuos leucina (Vourc'h et al., 2003b) y caracteriza a OMgp como miembro de la familia de proteínas LRR. Además, es esta región la que permite que OMgp se una a NgR1 (Wang et al., 2002b). Las proteínas LRR están implicadas en interacciones proteína-proteína y desempeñan diversas funciones como reparación de ADN, procesamiento de ARN, supervivencia neuronal, adhesión celular, transducción de señales y guía axonal (Kobe and Kajava, 2001). Algunos ejemplos de proteínas LRR con función en el SNC son Lingo-1, NgR1, Slit, Amigo, Trk y Neuregulina-1.

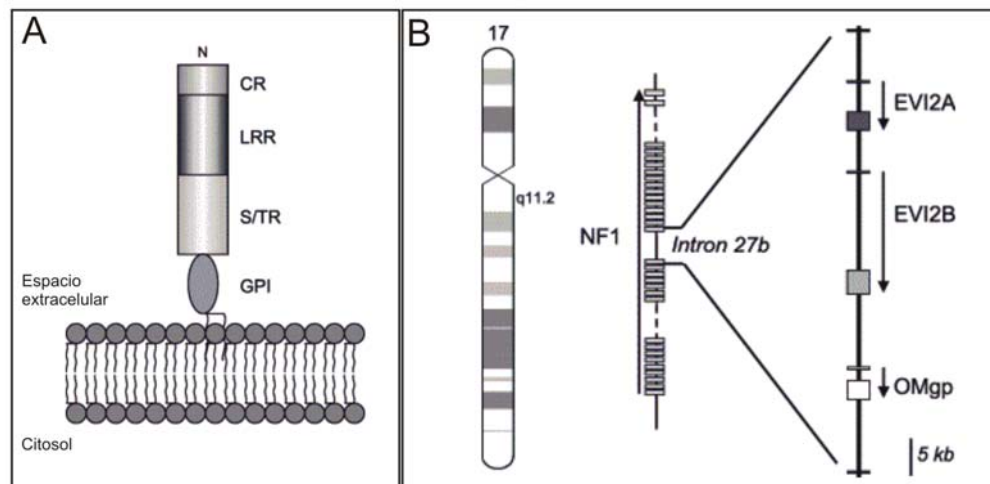


Figura 14. A) Representación esquemática de la forma madura de OMgp. CR es región rica en Cisteína; LRR, es región rica en repeticiones de Leucina; S/TR, región rica en Serina/Treonina y GPI es dominio glucosilfosfatidilinositol. B) Localización cromosómica del locus NF1 en el cromosoma 17. Los genes OMgp, EVI2A y EVI2B están embebidos dentro del intrón 27b del gen NF1. Las flechas indican la orientación de la transcripción y las cajas representan las regiones codificantes. *Adaptado de Vourc'h y Andres, 2004.*

El esqueleto proteico de la forma madura de OMgp se corresponde con un peso molecular de 46 kDa. Sin embargo, debido a modificaciones postraduccionales de glicosilación, su peso final es de 110-120 kDa (Mikol et al., 1990b). En el dominio LRR tienen lugar procesos de N-glicosilación (en residuos asparragina), mientras que en el dominio S/TR se da N-glicosilación y O-glicosilación (en residuos Serina y Treonina). Además de estas glicosilaciones, Mikol describió que existe una subpoblación de proteínas OMgp, presentes en extracto total de cerebro pero no en extractos de sustancia blanca, que contiene el **epítipo HNK-1** (del inglés *human natural killer-1*), un trisacárido sulfatado: $\text{HSO}_3\text{-3GlcA}\beta\text{1}\rightarrow\text{3Gal}\beta\text{1}\rightarrow\text{4GlcNAc}$. Este carbohidrato, se une a complejos de N-oligosacáridos de diversas glucoproteínas del SNC y desempeña funciones de adhesión celular. Además, se ha observado que los ratones deficientes en este epítipo muestran alteraciones en aprendizaje espacial y plasticidad sináptica (Schachner and Martini, 1995; Yamamoto et al., 2002). Sin embargo, el papel funcional de este epítipo, presente sólo en un subpoblación de OMgp, es aún desconocido.

El gen *omgp* humano fue localizado en la región q11-12 del cromosoma 17. Este gen está embebido dentro del intrón 27b del gen NF1, que codifica para la proteína Neurofibromina, una proteína que cuando muta causa la enfermedad neurofibromatosis tipo I (Mikol et al., 1990a). Junto a *omgp*, se localizan otros dos genes, EVI2A y EVI2B y los tres genes se transcriben en dirección opuesta al gen NF1 (Figura 14B). Esta

organización, también presente en el ratón, sugiere regulaciones transcripcionales particulares dentro del locus NF1.

Inicialmente, se describió la presencia de OMgp en oligodendrocitos, pero posteriormente se mostró que su localización mayoritaria se daba en neuronas (Habib et al., 1998b). En concreto, se describió que en el adulto, OMgp estaba presente en neuronas de proyección como las neuronas piramidales del hipocampo, neuronas de Purkinje del cerebelo, neuronas del hipotálamo y motoneuronas del tronco cerebral. El patrón temporal de expresión de OMgp ha sido caracterizado durante el desarrollo postnatal del SNC, y muestra un aumento progresivo desde el nacimiento hasta el adulto (Habib et al., 1998b; Vourc'h et al., 2003a). Sin embargo, en el momento de iniciarse este trabajo no existían estudios que analizaran la presencia de OMgp en estadios embrionarios.

Función de OMgp en proliferación celular

Como se ha comentado anteriormente, el gen *omgp* está embebido dentro del intrón 27b del gen NF1, que codifica para la proteína **Neurofibromina 1** (Mikol et al., 1990a). En condiciones normales, la proteína Neurofibromina 1 regula negativamente al proto-oncogen Ras mediante su actividad GTPasa. La mutación de la proteína ocasiona una disminución de la actividad GTPasa con la consiguiente proliferación de células mediadas por Ras-GTP. Esto da lugar a la enfermedad *neurofibromatosis tipo I*, un desorden caracterizado por neurofibromas (tumores formados por células de Schwann y fibroblastos), manchas en el iris (nódulos de Lisch), manchas “café con leche” en la piel, defectos en el aprendizaje, macrocefalia y predisposición a neurofibrosarcomas malignos y gliomas ópticos (Trovo-Marqui and Tajara, 2006).

Cuando se sobreexpresa el gen NF1 en células NIH3T3 se produce una inhibición en el crecimiento de estas células (Johnson et al., 1994). Sorprendentemente, Habib et al, observaron que OMgp, al igual que la Neurofibromina 1, tenía funciones supresoras de la proliferación cuando era sobreexpresado en fibroblastos NIH3T3 y además, inhibía vías de señalización relacionadas con aquéllas reguladas por la Neurofibromina 1 (Habib et al., 1998a). Además, se ha demostrado que para desempeñar esta función en células COS-7 es necesario el dominio LRR de OMgp y no su grupo GPI. Puesto que NgR1 no se expresa en este tipo celular, deben existir otros receptores de superficie necesarios para transducir las señales antiproliferativas al interior de las células

(Vourc'h et al., 2003b). Aunque esta acción supresora ha sido estudiada sólo en células NIH3T3 y COS-7, no se puede descartar que OMgp pueda desempeñar una función similar en neuronas y oligodendrocitos, tanto en el desarrollo como en el adulto. En línea con esto, recientemente se ha descrito que células madre neurales procedentes de embriones de rata expresan OMgp. La sobreexpresión de OMgp en neuroesferas procedentes de estas células madre reduce su proliferación aunque no afecta a su diferenciación en neuronas (Martin et al., 2009).

Función de OMgp en formación de nodos de Ranvier y en el proceso de mielinización

Además de su función como inhibidor del crecimiento axonal e inhibición de la proliferación celular, se ha sugerido que OMgp participa en la formación de los nodos de Ranvier y en la mielinización. Así, algunos estudios han descrito que OMgp se acumula en los nodos de Ranvier, en concreto en el límite entre el nodo y el paranodo (Huang et al., 2005; Nie et al., 2006), siendo este OMgp de origen oligodendroglial y no neuronal. Además, el ratón deficiente para OMgp presenta nodos de estructura anormal, sugiriendo que OMgp puede estar implicada en la formación de los mismos (Huang et al., 2005). En modelos animales de desmielinización, como el ratón *Shiverer*, deficiente en MBP (del inglés *Myelin Basic Protein*), la distribución de OMgp es ectópica y dispersa en vez de estar agrupada en los nodos. Estas observaciones indican que la presencia de OMgp en los nodos podría depender de la integridad de la mielina y de la polarización axonal subcelular. Otra evidencia que otorga a OMgp una función en la formación de los nodos de Ranvier es el hecho de que se requiere OMgp para la correcta expresión de los canales de Na⁺ y de la conducción axonal (Nie et al., 2006). Además, los ratones deficientes en OMgp muestran una elevada reinervación axonal en la zona de los nodos, sugiriendo que la presencia de OMgp en los nodos puede estar implicada, además de en la formación de los mismos, en la inhibición de *sprouting* axonal aberrante durante el desarrollo (Huang et al., 2005).

Por otra parte, se ha descrito que OMgp se expresa en células precursoras de oligodendrocitos, oligodendrocitos mielinizantes y células similares a oligodendrocitos que circundan los nodos (Nie et al., 2006). También se observó, que la sobreexpresión de OMgp en oligodendrocitos inmaduros *in vitro* (línea celular OLN-93) promovía su arborización celular, sugiriendo que OMgp está implicado en la maduración oligodendroglial. En estudios realizados por Vourc'h, se ha descrito que la expresión de

OMgp en cultivos de oligodendrocitos aumenta coincidiendo con la pérdida de capacidad proliferativa de los mismos (Vourc'h et al., 2003a). Todos estos datos sugieren que OMgp puede estar implicado en el control de la proliferación y/o maduración de los oligodendrocitos.

3.4 NgR1

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

El gen *ngr* codifica para una proteína de 473 aminoácidos anclada a la membrana neuronal mediante dominio GPI y localizada en microdominios lipídicos (*lipid rafts*), que son microdominios de membrana con alto contenido en colesterol (32%) y esfingolípidos (14%) (Fournier et al., 2001). Al igual que OMgp, NgR1 pertenece a la familia de proteínas LRR. Contiene un dominio N-terminal rico en Leucinas (LRR-NT), seguido de ocho dominios LRR, un dominio C-terminal rico en Cisteínas (LRR-CT) y un dominio C-terminal único por el cual se une al grupo GPI (Barton et al., 2003) (Figura 15). Se han identificado dos homólogos para NgR1 en ratón y humanos, **NgR2** y **NgR3**, que muestran una homología del 55% entre ellos y un 45% de identidad respecto a NgR1 (Pignot et al., 2003). Aunque los tres comparten propiedades estructurales y un patrón de expresión similar, se ha descrito que NgR2 sólo es capaz de unirse a MAG, y no a OMgp ni a Nogo-A.



Figura 15. Vista ortogonal de la estructura de NgR1. El dominio LRRNT está representado en azul, los dominios LRR centrales en verde y el dominio LRRCT en rojo. Adaptado de Barton et al., 2003.

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

mientras que para la unión a OMgp se necesita a los dominios LRR y LRR-CT (Wang et al., 2002b). Debido a que MAG compite con Nogo-66 por la unión a NgR1, se ha sugerido que MAG se une también al dominio LRR-CT (Domeniconi et al., 2002). Sin embargo, se necesitan más estudios para clarificar qué dominios son necesarios para la unión a los diferentes ligandos y correceptores.

La región C-terminal única es requerida para la transducción de señal, probablemente mediante su unión a otros correceptores, mientras que el grupo GPI, aunque no es necesario para la señalización, modula la eficacia de la señalización. Además, el grupo GPI permite que NgR1 se localice en *lipids rafts* y proporciona una zona de escisión, por la cual se libera el fragmento NgR soluble. Este fragmento soluble puede antagonizar los efectos inhibitorios de Nogo-66 o de la mielina y tiene afinidad por NgR1 de superficie celular, lo que indica que puede formar homodímeros *in vivo* (Fournier et al., 2002).

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

inglés, *Tumor Necrosis Factor*) esencial para el desarrollo de células B y que se muestra en niveles elevados en pacientes con esclerosis múltiple. Se ha demostrado que la unión de BLYS a NgR1 inhibe el crecimiento neurítico en DRG. Además, la expresión de BLYS y NgR1 está asociada a astrocitos y microglía/macrófagos en zonas lesionadas de médula espinal. Así, BLYS puede funcionar independientemente de los inhibidores asociados de mielina y como ligando redundante de NgR1 para inhibir el crecimiento axonal (Zhang et al., 2009a).

Función de NgR1 en diferenciación celular

Como ya se ha comentado en el apartado correspondiente a Nogo-A (ver apartado 3.1), se ha descrito que NgR1, mediante su unión a Nogo-A, estaría implicado en funciones de diferenciación celular, como por ejemplo, diferenciación de las líneas embrionarias y diferenciación de precursores neuronales en células astrogiales.

Función de NgR1 en plasticidad sináptica

Recientemente, se ha propuesto un papel de NgR1 en plasticidad sináptica y procesos de LTP (del inglés *Long Term Potentiation*). Se ha descrito que, en cultivos corticales primarios, NgR1 inhibe la ramificación axonal inducida por FGF2 y que los ratones deficientes en NgR1 muestran una morfología alterada de las espinas dendríticas de la región CA1 del hipocampo (Lee et al., 2008).

3.5 p75^{NTR}

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

p75^{NTR}, es una proteína receptora perteneciente a la superfamilia TNFR (del inglés *Tumor Necrosis Factor Receptor*). La mayoría de los miembros de esta familia son proteínas transmembrana tipo I que presentan en su región extracelular (dominio Nt) un número variable de repeticiones ricas en Cisteína, implicadas en la unión a ligandos (Gruss and Dower, 1995). La proteína p75^{NTR} (75 kDa) consiste en una región extracelular con cuatro dominios IgG ricos en Cisteína, una región transmembrana y

una región intracelular con dominio de muerte (DD, del inglés *Death Domain*). Esta región intracelular no presenta actividad enzimática intrínseca, por lo que contiene motivos de unión a otros receptores o proteínas efectoras. Existen algunas diferencias entre p75^{NTR} y el resto de miembros de la familia TNFR, pues mientras la mayoría suele unirse a ligandos triméricos de la familia TNF, p75^{NTR} se une a dímeros de neurotrofinas. Además, el DD de p75^{NTR} no se autoasocia, aunque si conserva la capacidad de activar a otros mensajeros, por lo que la señalización de muerte que desencadena no es la misma que la generada por otros TNFR (para revisión (Chen et al., 2009)).

p75^{NTR} se expresa ampliamente durante el desarrollo del SNC y SNP, pero sus niveles de expresión disminuyen dramáticamente con la edad. Sin embargo, se ha visto que la expresión aumenta en situaciones patológicas relacionadas con muerte neuronal. Sin embargo, esta regulación de la expresión en el desarrollo también es específica de tipo celular, puesto que algunas poblaciones necesitan su expresión sólo de forma transitoria mientras que otras la expresan durante toda la vida del animal. En el ratón adulto, la expresión se reduce a un número pequeño de neuronas de proyección, como son neuronas sensoriales de DRG, motoneuronas de médula espinal, neuronas colinérgicas del telencéfalo basal, neuronas ganglionares de retina y neuronas de Purkinje del cerebelo. Además, también se expresa en diversas poblaciones gliales, como oligodendrocitos y células de Schwann, especialmente durante el desarrollo y tras lesión, y aunque son pocos los estudios focalizados en la función glial de esta proteína se piensa que pueda ejercer algún papel en la mielinización (Chen et al., 2009; Roux and Barker, 2002).

Funciones de p75^{NTR}

Se trata de una proteína de señalización neuronal muy importante que interacciona con numerosos ligandos y correceptores para regular supervivencia neuronal y apoptosis, crecimiento neurítico y repulsión, formación de mielina y depresión a largo plazo (LTD, del inglés *Long Term Depression*) (para revisión (Schechterson and Bothwell, 2008; Underwood and Coulson, 2008)). Estas interacciones con diversos correceptores parecen estar reguladas diferencialmente por modificaciones postranscripcionales de p75^{NTR}, por su localización intracelular y por el estado de diferenciación celular. Pero además, p75^{NTR} puede iniciar cascadas de señalización en ausencia de ligandos. Esto

conlleva a que el espectro de funciones que se le han atribuido sea muy amplio. Por ello, en la Figura 16 se muestran sólo tres mecanismos de acción generales, en función de su unión a diferentes ligandos y correceptores (Barker, 2004).

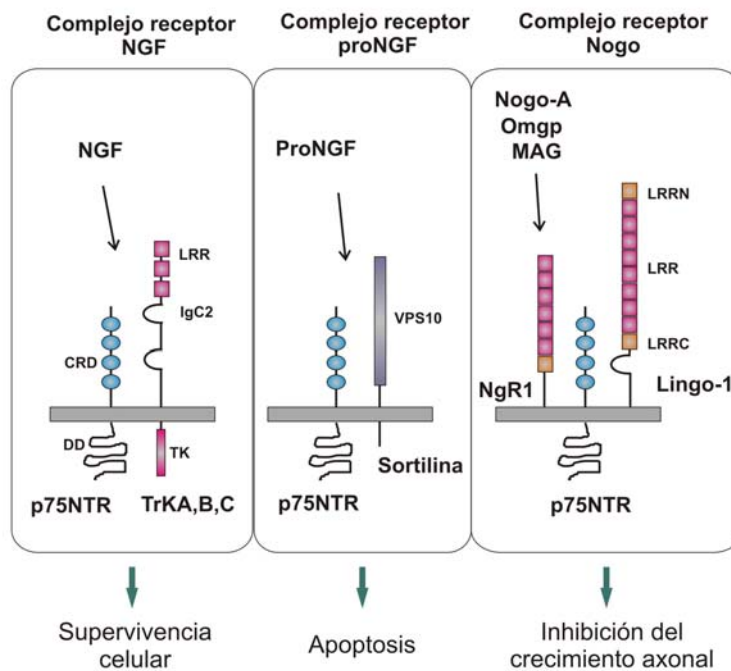


Figura 16. Diferentes complejos de señalización formados por $p75^{NTR}$.

Complejo receptor NGF: $p75^{NTR}$ interactúa con el receptor TrkA y estimula la habilidad de TrkA para responder a la neurotrofina NGF, desencadenando una respuesta de supervivencia celular. **Complejo receptor proNGF:** $p75^{NTR}$ interactúa con Sortilina para mediar señales apoptóticas en respuesta a proNGF. **Complejo Nogo receptor:** $p75^{NTR}$ forma un complejo tripartito junto a NgR1 y Lingo-1 para responder a la unión de Nogo-A, MAG u OMgp.

Abreviaturas: CRD, dominio rico en Cisteínas; DD, dominio de muerte; LRR, dominio rico en repeticiones Leucina; IgC2, dominio IgC2; TK, dominio Tirosina quinasa; VPS10, dominio VPS10; LRRN, dominio N-terminal con LRR; LRRCC, dominio C-terminal con LRR.

En un primer momento, se identificó a $p75^{NTR}$ como un receptor para la neurotrofina NGF, aunque después se vio que también era receptor para el resto de neurotrofinas (BDNF, NT3 y NT4/5) y de sus respectivas formas inmaduras (proneurotrofinas).

La unión de $p75^{NTR}$ a proneurotrofinas (unión de alta afinidad) está mediada por la interacción con el correceptor Sortilina y produce una compleja respuesta intracelular de apoptosis. Por el contrario, la unión a neurotrofinas (unión de baja afinidad) requiere la interacción con receptores TrK (del inglés *Tropomyosin receptor kinase*) y la respuesta que se desencadena es de supervivencia celular y crecimiento axonal. En cuanto a la inhibición del crecimiento axonal, éste se produce mediante la unión de $p75^{NTR}$ a factores asociados a mielina, pero también a la formación de complejos con Efrinas y plexinas/neuropilinas (Schechterson and Bothwell, 2008).

3.6 TROY/TAJ

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

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

En el embrión de ratón, TROY (*TNFRSF expressed on the mouse embryo*) está presente a nivel de ARNm principalmente en cerebro y derivados epiteliales, aunque también se expresa de forma moderada en pulmón, hígado, corazón (Kojima et al., 2000). En el SNC en desarrollo, TROY se expresa fuertemente en ZV y ZSV de diversas regiones, incluyendo corteza cerebral, tálamo e hipocampo pero disminuye hacia estadios más tardíos de la neurogénesis (Hisaoaka et al., 2003). También se expresa en bulbo olfativo en desarrollo, desde E13.5 hasta estadios neonatales. En la etapa adulta, la expresión de TROY disminuye, al igual que la de $p75^{\text{NTR}}$ (Figura 17), pero sus niveles se mantienen más altos que los de $p75^{\text{NTR}}$, lo que sugirió que TROY podía sustituir a $p75^{\text{NTR}}$ en el complejo Nogo Receptor. Además, a diferencia de $p75^{\text{NTR}}$, la cual se expresa sólo en determinadas poblaciones neuronales, TROY se expresa ampliamente en diversos tipos celulares del cerebro incluyendo neuronas, astrocitos, microglía y células de glía envolvente. Pero sobretodo, es de gran interés el hecho que TROY se exprese en células

proliferativas positivas para GFAP de la SVZ y de la vía de migración rostral (RMS, del inglés *Rostral Migratory Stream*) de ratones adultos (Hisaoaka et al., 2006).

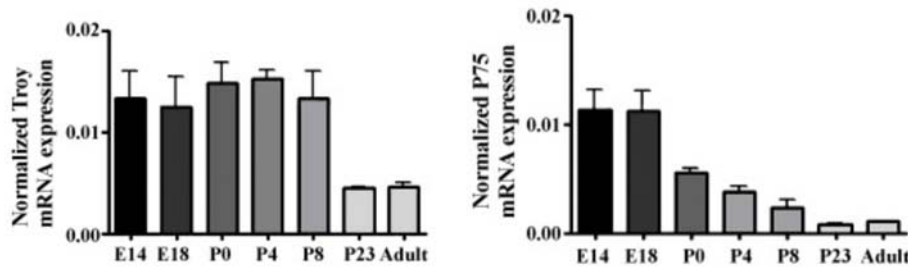


Figura 17. Niveles de expresión de ARNm de TROY y p75^{NTR} por PCR en tiempo real en SNC de ratón. Los datos fueron normalizados respecto a niveles de ARNm de GADPH. *Adaptado de Mi, 2008.*

Funciones de TROY en desarrollo

Como se ha comentado, TROY se expresa fuertemente en derivados epiteliales y folículos pilosos del embrión. Además, la región extracelular de TROY comparte una gran homología de secuencia con dos miembros de la superfamilia TNFR, los receptores Edar y XEDAR, implicados en el desarrollo de la piel y en la inducción de los folículos pilosos en el embrión mediante la interacción con TRAF6. Esto hace pensar que TROY podría ejercer funciones similares a estos receptores durante el desarrollo (Kojima et al., 2000). Además, también ha sido implicado en la regulación del crecimiento celular de melanomas, así como también en el desarrollo dental (para revisión (Mi, 2008)).

Por otra parte, se ha descrito que la sobreexpresión de TROY induce la activación de vías JNK y NF- κ B, por lo que podría estar regulando procesos de supervivencia y apoptosis independiente de caspasas durante el desarrollo (Eby et al., 2000; Kojima et al., 2000). De ahí que también reciba el nombre de TAJ (del inglés *toxicity and JNK inducer*).

Función de TROY en el adulto

Además de su función en inhibición de crecimiento axonal inducido por mielina, la presencia de TROY en precursores astrogiales sugiere que podría estar actuando también en procesos de proliferación y diferenciación astrogial en el adulto (Hisaoaka et

al., 2003; Hisaoka et al., 2006). No obstante, dado que TROY no interacciona con neurotrofinas y que se desconocen otros posibles ligandos, las funciones que TROY ejerce tanto en desarrollo como en adulto aún están por caracterizar.

3.7 Lingo-1

Debido a que la cotransfección de NgR1 y p75^{NTR} (o TROY) en células no neuronales era incapaz de activar la vía de señalización de RhoA, se prosiguió en la búsqueda de nuevas proteínas capaces de interactuar con NgR1. Así fue cómo se identificó a **Lingo-1** (*LRR and Ig domain-containing, Nogo Receptor interacting protein*) como miembro del complejo receptor (Mi et al., 2004). Esta proteína se asemejaba a una proteína llamada **LERN1** (*Leucine-rich repeat neuronal protein 1*) que estaba codificada por un gen implicado en la predisposición a desórdenes de pánico/ansiedad (Carim-Todd et al., 2003).

Lingo-1 es una proteína transmembrana tipo I, codificada por el gen *Lrn6a* (*Leucine rich repeat neuronal 6a*). Su parte extracelular contiene 9 dominios LRR, flanqueados por dominios LRR en N y C-terminal y un dominio IgC2, el cual está implicado en interacciones proteína-proteína (Figura 18). El dominio citoplasmático es de corta longitud y contiene un sitio de fosforilación en Tirosina similar a EGFR (Carim-Todd et al., 2003; Mi et al., 2004).

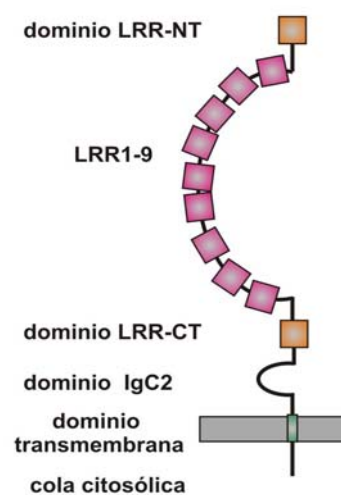


Figura 18. Representación esquemática de la estructura en dominios de la proteína Lingo-1. Adaptado de Carim-Todd et al., 2003.

Lingo-1 pertenece a una subfamilia de proteínas con LRR que comprende a otros tres parálogos: Lingo-2, Lingo-3 y Lingo-4, con los que comparte poca homología a nivel de proteína (61, 56 y 44 % de identidad respectivamente). Por el contrario, Lingo-1 muestra un alto grado de conservación entre especies, siendo la homología entre los

ortólogos de ratón y humano de un 99,5%, lo que sugiere que Lingo-1 desempeña funciones críticas en vertebrados.

Diversos estudios han demostrado que Lingo-1, a nivel de ARNm se expresa exclusivamente en el SNC, durante el desarrollo y en estadios adultos de rata y ratón. Además, se ha observado un gradiente rostrocaudal, encontrándose los niveles más elevados en estructuras telencefálicas y un gradiente temporal, ya que el ARNm disminuye con la edad (Carim-Todd et al., 2003; Mi et al., 2004). Sin embargo, no se ha determinado el patrón de expresión de Lingo-1 a nivel de proteína, siendo el único dato preciso la presencia de Lingo-1 en neuronas granulares y de Purkinje de cerebelo (Mi et al., 2004). Así como tampoco se ha demostrado si la proteína Lingo-1 se expresa en las mismas regiones y en las mismas etapas que el resto de miembros del complejo receptor.

Función de Lingo-1 en desarrollo

Además de su implicación en inhibición del crecimiento axonal, es posible que Lingo-1 ejerza otras funciones adicionales, principalmente durante el desarrollo del SNC. Por ejemplo, teniendo en cuenta que el ARNm de Lingo-1 se expresa en estadios tempranos del SNC en desarrollo, en los cuales aún no se ha expresado NgR1, es bastante probable que desarrolle alguna función no relacionada con la inhibición por mielina. Por otra parte, Lingo-1 fue descubierto en una base de datos de secuencias de homólogos de Slits humanos que se expresaban específicamente en cerebro (Mi et al., 2004). Los Slits son moléculas implicadas en guía axonal y migración celular, pero además Slit2 también está implicado en inhibición de la regeneración axonal al ser expresado por astrogliá reactiva (apartado 2.1). Por tanto, no podemos descartar que Lingo-1 desarrolle funciones similares a las de las proteínas Slit.

Existen otras proteínas con gran similitud estructural a Lingo-1, como las familias AMIGO/Alivin, NLRR, FLRT y NGL-1, todas ellas con función reguladora del crecimiento neurítico (para revisión (Chen et al., 2006a) (Figura 19). Todas presentan un número variable de dominios LRR, flanqueados por dominios LRR-NT y LRR-CT, y un dominio IgC2. De entre todas estas proteínas, la que muestra mayor homología es NGL-1, una proteína implicada en el desarrollo de la conexión cortico-talámica al promover el crecimiento de los axones talámicos mediante la interacción con Netrina. Por tanto, el patrón de expresión de Lingo-1 y su homología estructural con moléculas

de guía axonal sugieren que Lingo-1 podría estar actuando en procesos de guía axonal y migración neural.

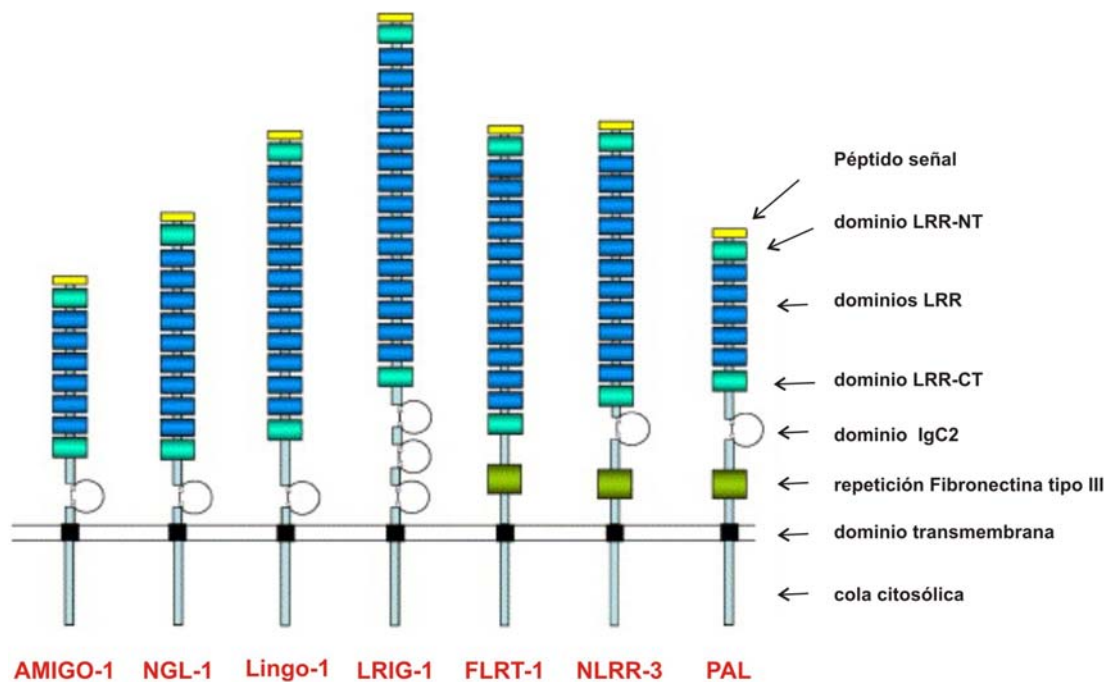


Figura 19. Representación esquemática de la organización en dominios de proteínas transmembrana con LRR. *Adaptado de Chen et al., 2006.*

Función de Lingo-1 en diferenciación oligodendroglial y mielinización

Por otra parte, se han atribuido otras funciones a Lingo-1, como son la regulación de la diferenciación de oligodendrocitos y mielinización. Se ha descrito que Lingo-1 está presente en oligodendrocitos y células progenitoras de oligodendrocitos y que ejerce un papel modulador negativo de la mielinización del SNC (Mi et al., 2005). Así, la sobreexpresión de Lingo-1 conlleva la inhibición de la diferenciación oligodendroglial y de la mielinización. Por el contrario, la pérdida de función de Lingo-1 en oligodendrocitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Lingo-1 *knockout*) conlleva un aumento en longitud y número de los procesos de los oligodendrocitos y un aumento de la formación de vainas de mielina. Sorprendentemente, esta inhibición de la maduración de oligodendrocitos se lleva a cabo mediante la activación de la vía RhoA. Esta función de Lingo-1 también ha sido estudiada en un contexto de desmielinización, como es el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental en rata (EAE, del inglés *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) (Mi et al., 2007). En él se ha visto que la pérdida de función de Lingo-1, en el animal deficiente para Lingo-1 o con tratamientos bloqueantes de su función, disminuye los síntomas de la enfermedad, mejora la

integridad axonal y favorece la mielinización al promover la diferenciación de precursores en oligodendrocitos mielinizantes maduros. No obstante, se ha demostrado que Lingo-1 neuronal (al menos en neuronas DRG) también es capaz de inhibir la diferenciación oligodendroglial y la mielinización a través de la estimulación de TrkA por NGF (Lee et al., 2007). Esto implicaría que no sólo los oligodendrocitos sino también los axones que van a ser mielinizados participan en el proceso de mielinización.

Función de Lingo-1 en neurodegeneración

También se ha relacionado a Lingo-1 con una función neurodegenerativa, ya que la inhibición de éste protege a neuronas dopaminérgicas de una neurodegeneración inducida en un modelo experimental de enfermedad de Parkinson. Además, se ha visto que los pacientes tienen niveles aumentados de Lingo-1 en la *substantia nigra*, lo que implicaría que Lingo-1 puede estar promoviendo la degeneración en esta enfermedad. Según este modelo, en condiciones normales, Lingo-1 reclutaría a EGFR regulando negativamente la vía de señalización EGFR/Akt. En cambio, la inhibición de Lingo-1 aumentaría los niveles de EGFR favoreciendo la supervivencia neuronal (Inoue et al., 2007a). En la Figura 20 se muestran las distintas vías de señalización en las que interviene Lingo-1.

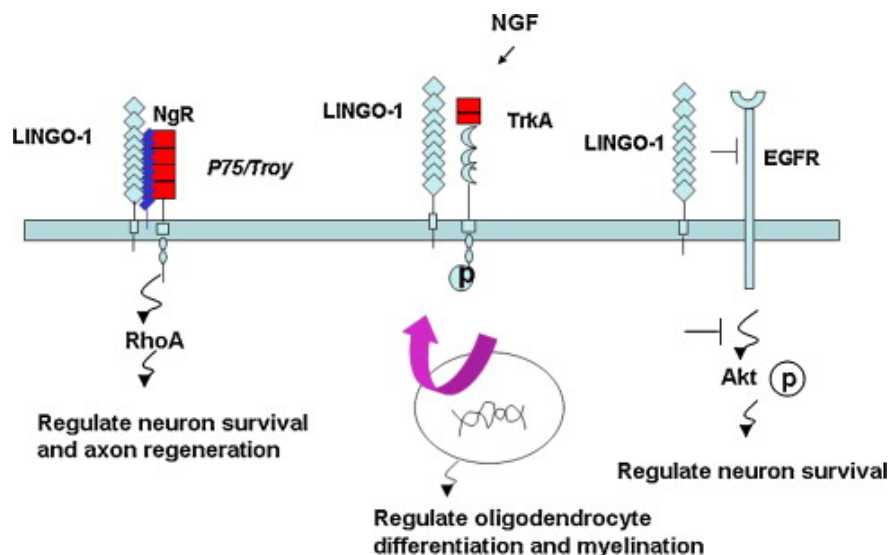


Figura 20. Mecanismos de señalización de Lingo-1. Adaptado de Mi et al., 2008.

Función de Lingo-1 en plasticidad

Otros estudios sugieren que Lingo-1 puede estar implicado en procesos de plasticidad neural inducidos por actividad (Trifunovski et al., 2004). Así, en un modelo de plasticidad como es el de administración intraperitoneal de ácido kaínico, se observó un aumento en los niveles de ARNm de Lingo-1 en el giro dentado de rata, al contrario de lo que ocurría con los niveles de NgR1.

IV. LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA

4.1 Anatomía básica

La formación hipocámpica (FH) ha atraído la atención de los neuroanatomistas desde los comienzos del estudio formal del sistema nervioso, y la mayor parte de información acerca de la organización celular y de sus conexiones intrínsecas procede de los estudios clásicos mediante tinción de Golgi de Ramón y Cajal y Lorente de Nó (Lorente de Nó, 1933; Lorente de Nó, 1934; Ramon y Cajal, 1911). Su gran complejidad citoarquitectónica, la organización laminar de sus conexiones, así como su preciso e intrincado patrón de conectividad son características que van a determinar y posibilitar su funcionalidad.

Esta estructura tiene un papel destacado en procesos mentales superiores como la memoria y el aprendizaje. En lo que respecta a la memoria, participa en procesos de memoria, tanto de trabajo como espacial (Morris et al., 1982; O'Keefe and Conway, 1978; O'Keefe and Speakman, 1987), en la adquisición de memoria declarativa a corto plazo (Squire, 1987; Watanabe and Niki, 1985) y, en definitiva, en el mapeo cognitivo. En el aprendizaje participa en la detección de estímulos novedosos y, por tanto, en los procesos de habituación, sensibilización y en el condicionamiento clásico (Berger, 1984; Segal and Olds, 1972). Otra función atribuida es la de participar en la conducta de búsqueda y en la respuesta al estrés (Lynch et al., 1988). Cuando se produce una lesión en esta región tiene lugar una incapacidad para formar nuevas memorias (amnesia anterógrada), pero también puede afectar a memorias formadas antes del daño (amnesia retrógrada). Sin embargo, no afecta al aprendizaje de nuevas tareas o habilidades motoras o cognitivas.

La estructura tridimensional de la FH es muy compleja. Su eje rostrocaudal se extiende en forma de “C”, formando un semicírculo alrededor del tálamo (Figura 21). El término comprende distintas regiones: el *hipocampo propio* (a partir de ahora referido simplemente como “hipocampo”), el *giro dentado*, la *corteza entorrinal* y el *complejo subicular* (Amaral and Witter, 1995).

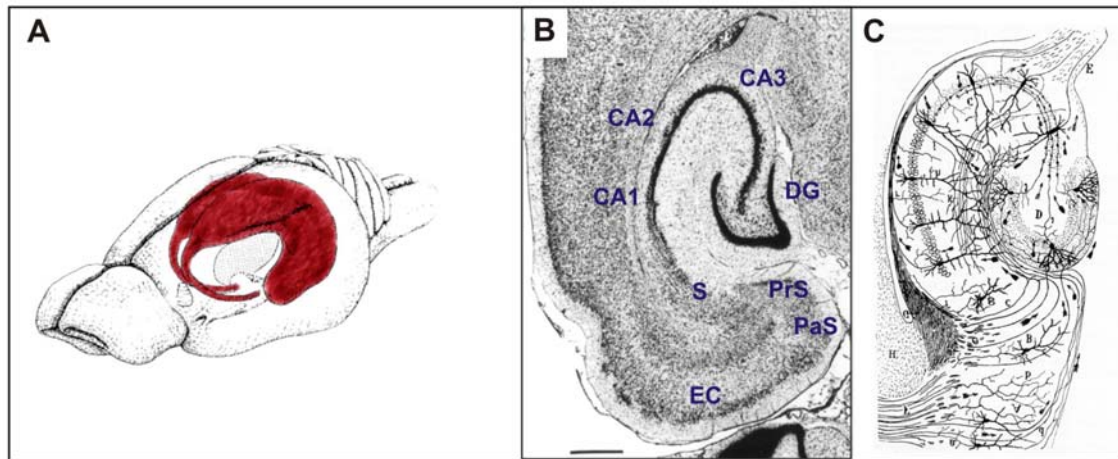


Figura 21. Formación hipocámpica de rata. **A)** Representación tridimensional del hipocampo de rata (*Adaptado de Amaral y Witter, 1995*). **B)** Imagen en blanco y negro de una sección horizontal de la formación hipocámpica de rata teñida mediante la tinción de Nissl. (*Adaptado de Witter y Amaral, 2004*). **C)** Dibujo de Ramón y Cajal de los circuitos neuronales de la formación hipocámpica (*Adaptado de Ramón y Cajal, 1901*). Abreviaturas: CA1-CA3, Cornu ammonis 1-3; DG, giro dentado; EC, corteza entorrinal; PaS, parasubiculum; PrS, presubiculum; S, subiculum; Escala: 500 μ m

El giro dentado

El giro dentado (DG) o *fascia dentata* es una estructura laminada formada por tres capas muy diferenciadas (Figura 22):

-Capa molecular o *stratum moleculare*. Es la capa más próxima a la fisura hipocámpica y contiene los árboles dendríticos de las células granulares así como diversos tipos de interneuronas. Dicha capa se subdivide en tres substratos, interno, medio y externo, en función del origen de los axones aferentes que contactan con los árboles dendríticos de las células granulares. El interno (iml, del inglés *inner molecular layer*) recibe aferencias asociativas/comisurales de células musgosas, mientras que los estratos medio (mml, *medial molecular layer*) y externo (oml, *outer molecular layer*) reciben las proyecciones de la vía perforante.

-Capa granular o *stratum granulosum*. Está formada por los somas de las células principales del giro dentado, las *neuronas granulares*, que se agrupan en filas densamente empaquetadas. Junto con la capa molecular forma una V o U (dependiendo de la posición anteroposterior) dejando al hilus en su interior. A lo largo de la superficie de la capa granular se localizan otros tipos celulares, la mayoría de ellos interneuronas inhibitorias (Amaral and Witter, 1995). Las células granulares tienen sus árboles

dendríticos localizados en la capa molecular mientras que sus axones, las llamadas *fibras musgosas*, opuestos a las dendritas atraviesan el hilus para contactar con la dendritas de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo, formando botones sinápticos de gran tamaño conocidos como *terminales musgosas* (Amaral and Witter, 1995; Freund and Buzsaki, 1996). Por otra parte, la región de la capa granular más cercana al hilus es conocida como *zona subgranular* y constituye una zona de proliferación de precursores neuronales en estadios adultos (Amaral and Witter, 1995; Amaral et al., 2007).

-Hilus o **capa polimórfica** es la capa más superficial del DG. Su principal componente celular son las *células musgosas*, aunque también presenta otros tipos celulares minoritarios. Las células musgosas hacen sinapsis con las dendritas de las células granulares, situadas en la capa molecular del DG, siendo la inervación tanto ipsi como contralateral; las fibras contralaterales de las células musgosas forman la *proyección comisural* del DG (Amaral and Witter, 1995). Contiene también los axones de las células granulares que pasan por esta capa en dirección a la capa CA3 del hipocampo.

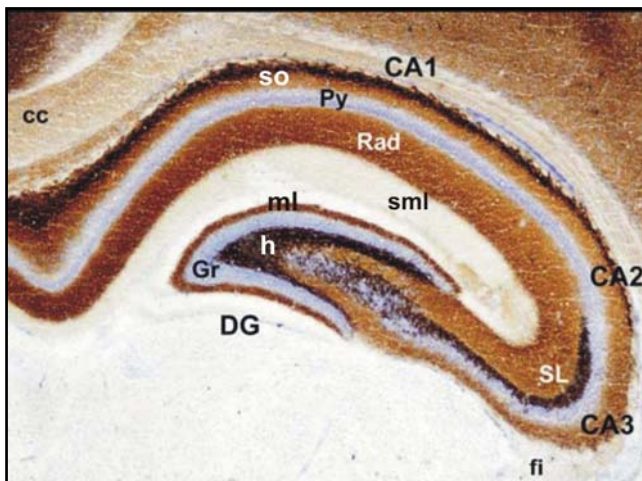


Figura 22. Sección coronal de hipocampo de ratón, teñido con doble tinción de Timm-Nissl.

Abreviaturas: cc, corpus callosum; CA1-CA3, Cornu ammonis 1-3; DG, giro dentado; fi, fimbria; Gr, Capa granular del DG; h, hilus; ml, molecular layer; Py, capa piramidal; RAD, stratum radiatum; sml, stratum lacunosum-moleculare; so, stratum oriens.

El hipocampo propio

El hipocampo consta de tres regiones, llamadas CA (por *Cornu ammonis*, o cuerno de Amón): CA1, CA2 y CA3. Entre las regiones CA1 y CA3 existen diversas diferencias en cuanto al tamaño de sus células principales (neuronas piramidales) y al patrón de conexión. Al igual que el DG, el hipocampo está estructurado en tres capas o estratos

principales y claramente definidos, los cuales están presentes en las tres regiones CA (Amaral and Witter, 1995) (Figura 22).

-Estrato piramidal o *stratum pyramidale* contiene los cuerpos o somas de las células principales del hipocampo, las *neuronas piramidales*, que son de mayor tamaño en la región CA3 que en CA1. También este estrato contiene los somas de células en cesto inhibitorias de diferentes formas y tamaños, cuyos axones se extienden formando un plexo en forma de cesto que inerva los somas de neuronas piramidales (Seress and Ribak, 1984).

-Alveus. Es la capa más profunda y contiene los axones de las neuronas piramidales que se dirigen a la fimbria/fornix. Es la sustancia blanca del hipocampo.

-Estrato *oriens*. Es la capa adyacente a capa piramidal y contiene las dendritas basales de las neuronas piramidales.

-Estrato *lucidum*. Esta estrecha capa sin células es adyacente y superficial a la capa piramidal, pero sólo esta presente en región CA3. Además, marca el límite entre CA3-CA2. Contiene las fibras musgosas del DG aunque las sinapsis de estas fibras tienen lugar en el estrato piramidal.

-Estrato *radiatum*. Se sitúa superficial al estrato lúcido en CA3 y al estrato piramidal de CA2 y CA1, y contiene las dendritas apicales de las neuronas piramidales.

-Estrato *lacunosum-moleculare*. Es la capa más superficial del hipocampo, y donde termina, entre otras, la conexión procedente de la corteza entorrinal, llamada *vía perforante*. También contiene, al igual que el estrato radiatum, las dendritas apicales de las neuronas piramidales.

-Fisura hipocámpica. Es una región carente de células que separa la región CA1 del giro dentado.

Como ya se ha mencionado, el tipo celular principal del hipocampo es la neurona piramidal, de naturaleza excitatoria. Sin embargo, existen otras neuronas no piramidales con características inhibitorias que se distribuyen por todas las regiones y capas del hipocampo propio y del DG. En su mayoría son inmunoreactivas para GABA (Freund and Buzsaki, 1996; Pettit and Augustine, 2000; Ribak et al., 1978) por lo que se consideran interneuronas que forman circuitos locales inhibidores (ver apartado 4.2).

La corteza entorrinal

La corteza entorrinal (CE) es una estructura laminada, con las seis capas típicas de una estructura neocortical. Se distinguen dos capas acelulares (capas I y IV) y cuatro capas celulares (capas II, III, V, VI) (Amaral and Witter, 1995):

-Capa I. es la más superficial, con muy pocas neuronas. Contiene células GABAérgicas que proyectan al DG y al hipocampo.

-Capa II. Contiene mayoritariamente células estrelladas (neuronas piramidales modificadas) que tienden a agruparse formando islas celulares. Estas células son la principal fuente de fibras de la vía perforante, la cual proyecta a región CA3 del hipocampo y al DG. También contiene otros tipos celulares: piramidal, multipolar, horizontal, que contribuyen también a la proyección de la vía perforante. La mayoría de las neuronas de la capa II distribuyen sus dendritas entre las capas I y III.

-Capa III. La mayoría de sus células son piramidales y proyectan hacia el *subiculum* y región CA1 del hipocampo mediante la vía perforante. Además, en esta capa coexisten otros tipos celulares, como estrelladas, fusiformes, horizontales y bipolares, lo que le da a la capa un aspecto heterogéneo, formando parte todas ellas de la vía perforante.

-Capa IV. También llamada *lamina dissecans*, es una capa básicamente acelular.

-Capa V. La parte superior o capa Va está formada esencialmente por neuronas piramidales de gran tamaño, además de células multipolares, horizontales y estrelladas. La parte inferior o capa Vb contiene neuronas piramidales más pequeñas y tipos celulares polimórficos, y algunas de ellas contribuyen a la proyección hacia el hipocampo y DG.

-Capa VI. Contiene una población muy heterogénea en cuanto a tamaño y forma. Parte de esta población también proyecta al hipocampo y DG (Amaral and Witter, 1995). Las capas V y VI también proyectan a áreas fuera de la formación hipocámpica, principalmente a estructuras corticales.

Como ocurre en el hipocampo, existen interneuronas GABAérgicas en todas las capas de la CE, siendo más abundantes en las capas superficiales.

Por otra parte, la CE se subdivide en dos regiones: el *área entorrinal medial* o MEA (del inglés *Medial Entorrinal Area*), adyacente al hipocampo, y el *área entorrinal lateral* o LEA (del inglés *Lateral Entorrinal Area*), adyacente a la corteza perirrinal. Existen diferencias en cuanto a sus propiedades histoquímicas y fisiológicas, además de

sus patrones de terminación en el hipocampo y de sus aferencias (Amaral and Witter, 1995; Kerr et al., 2007).

El complejo subicular

El complejo subicular se sitúa en la zona de transición entre la CE y el hipocampo. Se subdivide en tres áreas: *parasubiculum* (PaS), *presubiculum* (PreS) y *subiculum* (S) (Figura 21).

El *subiculum* se sitúa adyacente a la región CA1, de manera que sus capas piramidal y molecular son continuas a la capa piramidal y estrato radiatum de CA1, respectivamente, mientras que el estrato oriens no tiene continuidad en el *subiculum* y queda interrumpido. Recibe aferencias de CA1 y la capa III de neuronas piramidales de la CE (a través de la vía perforante) y es la principal zona eferente del hipocampo.

4.2 Interneuronas del hipocampo

Las interneuronas GABAérgicas desempeñan un papel fundamental en la función de la sistema nervioso, no sólo porque permiten la sincronización de las neuronas piramidales y mantienen la integridad de los circuitos, sino también porque ejercen una gran influencia en la diferenciación y la maduración de estas neuronas durante el desarrollo.

Uno de los principales problemas en el estudio de las interneuronas ha sido la imposibilidad de clasificar a las interneuronas en subpoblaciones anatómicas o funcionales bien definidas. Anatómicamente, las interneuronas representan una de las poblaciones celulares más diversas en el SNC de mamíferos, y esta clasificación basada solo en aspectos anatómicos no aporta conocimiento alguno acerca de su función. Sin embargo, si diferenciamos en base a la porción celular de las células dianas donde establecen contactos, sí que podremos conocer mejor sus funciones específicas. (McBain and Fisahn, 2001). Además, muchas de estas interneuronas GABAérgicas colocalizan con otras sustancias neuroactivas, como neuropéptidos y proteínas de unión a calcio. Sin embargo, células idénticas en contenido neuroquímico poseen propiedades funcionales sorprendentemente diferentes. Esta característica, junto con sus características morfológicas y su conectividad, ha permitido la identificación y clasificación de distintas poblaciones de interneuronas en el hipocampo y DG. Dichas

clasificaciones a menudo definen grupos de interneuronas que se solapan entre ellas, lo que indica la gran complejidad de esta población celular.

A) Interneuronas atendiendo a su morfología y conectividad

-Interneuronas axo-axónicas o de candelabro. Su axón forma hileras de botones sinápticos que contactan específicamente con el segmento inicial del axón de neuronas principales, y el soma se sitúa en la capa piramidal del hipocampo y en la capa granular del DG (Freund and Buzsaki, 1996). Contienen la proteína de unión a calcio, Parvalbúmina, pero no otros marcadores (neuropéptidos o proteínas de unión a calcio) hasta ahora conocidos (para revisión (Freund, 2003)).

-Células en cesto. Su terminal axónico adopta la forma de un cesto que envuelve el soma de las neuronas principales, y su soma se localiza en las capas piramidal o granular, o en su proximidades.

-Interneuronas que inervan las dendritas de neuronas principales, regulando la plasticidad y la eficacia del *input* excitatorio (Magloczky and Freund, 2005). Existen distintos tipos según la distribución de su árbol dendrítico y su contenido neuroquímico, todos ellos especializados en contactar con segmentos dendríticos específicos de las neuronas principales.

-Interneuronas especializadas en inervar otras interneuronas (IS, interneurona-selectiva). Hay tres tipos principales, según su conectividad y características neuroquímicas: IS-1, que contiene Calretinina, IS-2 e IS-3, ambas inmunoreactivas para Calbindina y VIP.

B) Interneuronas atendiendo su contenido en proteínas de unión a calcio

-**Calbindina.** Se localizan principalmente en estrato radiatum limitando con estrato lacunosum-moleculare y en las capas de neuronas principales. Existe una subpoblación de interneuronas que contienen Calbindina y Somatostatina, situadas en el estrato oriens/alveus del hipocampo que proyectan hacia el Septum Medial. Además de estas interneuronas, también las neuronas granulares del DG y neuronas piramidales superficiales de CA1 presentan inmunoreactividad para Calbindina (Figura 23).

-Parvalbúmina. Son interneuronas con somas grandes localizados en la capa piramidal y granular, y en general corresponden a células en cesto o axo-axónicas. (Freund, 2003).

-Calretinina. Existen dos poblaciones de interneuronas que contienen Calretinina: interneuronas espinosas y no espinosas. Las primeras están presentes en el hilus y estrato lucidum de CA3 y presentan grandes espinas que reciben contactos sinápticos de fibras musgosas del giro dentado. Las interneuronas no-espinosas son, en su mayoría, interneuronas IS, especializadas en inervar a otras interneuronas.

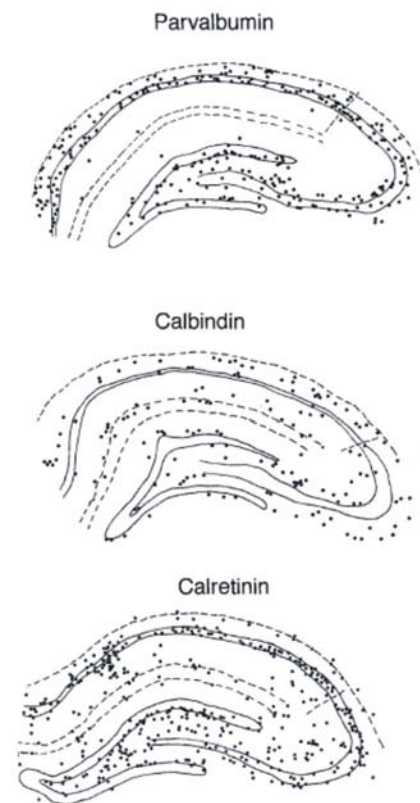


Figura 23. Dibujos a cámara *lucida* que ilustran la distribución de interneuronas en el hipocampo y DG según su contenido en proteínas de unión a calcio: Parvalbúmina, Calretinina y Calbindina. Adaptado de Freund y Buzsaki, 1996.

C) Interneuronas atendiendo a su contenido en neuropéptidos

-Somatostatina (SOM). Se localizan en el hilus, en el estrato oriens de CA1 y en los estratos oriens, piramidal, lucidum y radiatum de CA3. Aquellas que se localizan en el hilus son las HIPP (hilar perforant path-associated cell), interneuronas cuyas dendritas se restringen al hilus, y cuyo axón arboriza profusamente en los substratos oml y mml de la capa molecular, donde coincide con los axones entorrinales (adyacente al *input* de vía perforante). La interneuronas de CA1 y CA3 corresponden a células O-LM (oriens-lacunosum-moleculare), caracterizadas por tener un axón que ramifica exclusivamente en el estrato lacunosum-moleculare, coincidiendo allí con fibras entorrinales. La mayor parte de interneuronas de CA1, situadas en el estrato oriens/alveus colocalizan con Somatostatina y Calbindina y proyectan hacia el Septum medial (Freund and Buzsaki, 1996; Matyas et al., 2004b) (Figura 24).

-Neuropéptido Y (NPY). Se sitúan mayoritariamente en el hilus y capa granular del DG, en el estrato oriens y la capa piramidal de CA1 y en todas las capas de CA3 excepto en estrato lacunosum-moleculare. Muchas de las interneuronas inmunoreactivas para NPY comparten características con interneuronas positivas para Somatostatina (células HIPP y O-LM).

-Colecistoquinina (CCK). Se localizan en el hilus y la capa granular, y en el hipocampo ocupan mayoritariamente el estrato radiatum. Forman una subpoblación de células en cesto, independiente de aquella que contiene Parvalbúmina, e inervan la región perisomática de neuronas granulares, piramidales, interneuronas y células musgosas (Matyas et al., 2004a).

-Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP). En el DG existen dos poblaciones distintas: una población localizada en la capa granular o proximidades, correspondiente a células en cesto que contactan con el soma de células granulares y que también contienen CCK. Y otra población que se sitúa en el hilus o estrato molecular, colocalizan Calretinina y VIP y está formada por interneuronas que inervan otras interneuronas (concretamente del tipo IS-3). En el hipocampo, se distinguen tres poblaciones de interneuronas VIP-positivas, distribuidas por todas sus capas.

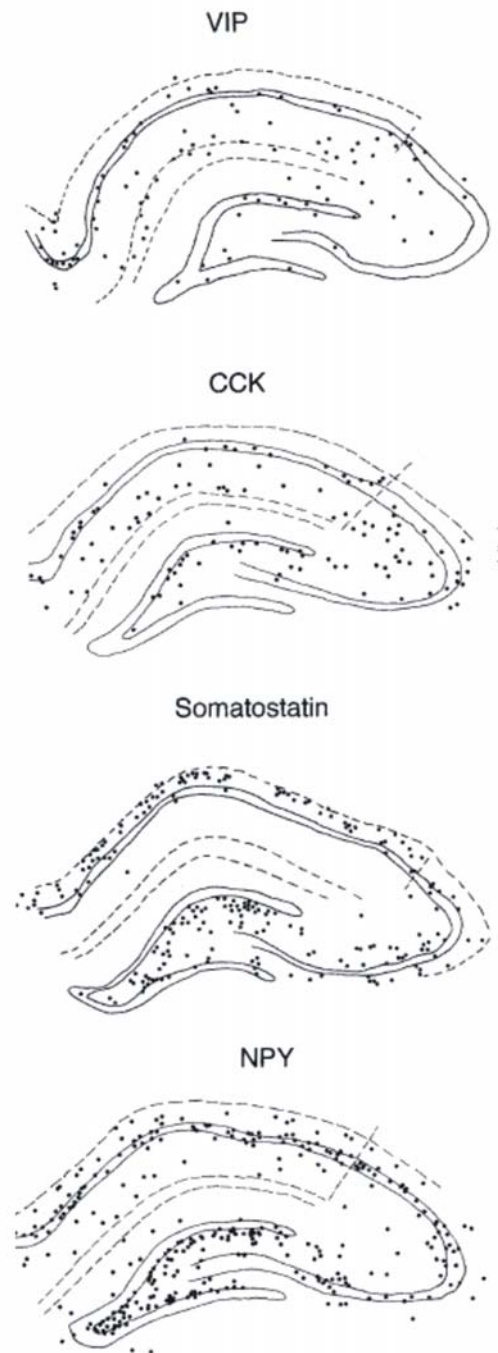


Figura 24. Dibujos a cámara *lucida* que ilustran la distribución de interneuronas en el hipocampo y DG según su contenido en neuropéptidos: Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), Colecistoquinina (CCK), Somatostatina y Neuropéptido Y (NPY). Adaptado de Freund y Buzsáki, 1996.

4.3 Principales conexiones de la formación hipocámpica

4.3.a. Conexiones intrínsecas: el circuito trináptico clásico

El término de FH, como ya se ha comentado, agrupa varias regiones corticales: el hipocampo (formado por el hipocampo propio y el DG), la CE y el complejo subicular. La principal justificación para incluir a estas regiones dentro de esta agrupación es la existencia de un flujo unidireccional, serial y secuencial de la información procesada por sus conexiones intrínsecas, hecho extremadamente atípico entre conexiones cortico-corticales (donde lo normal es que haya un flujo recíproco de información). Las conexiones unidireccionales de la formación hipocámpica son tres: la *vía perforante*, las *fibras musgosas* y las *fibras colaterales de Schaffer* (Figura 25).

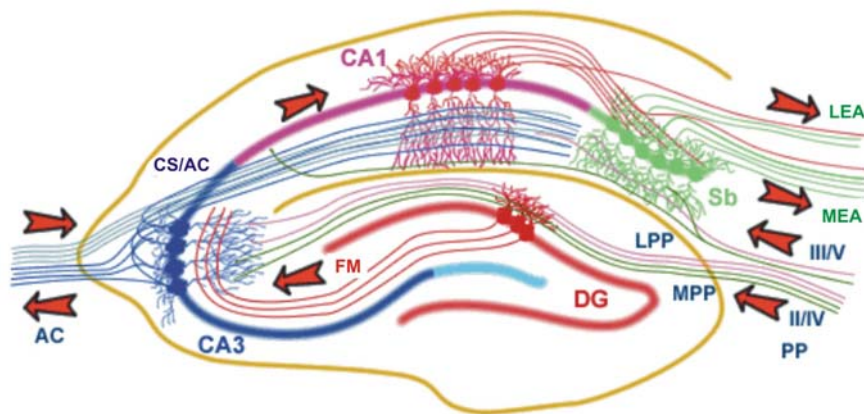


Figura 25. Principales conexiones de la formación hipocámpica. El hipocampo forma un circuito con la entrada de información desde CE (vía perforante, PP) hacia DG, CA1 y CA3. El DG envía conexiones a CA3 mediante fibras musgosas (FM). La región CA3 envía a CA1 mediante colaterales de Schaffer (comisurales y asociativas, CS/AC). La región CA1 proyecta a *subiculum* y éste a CE, con lo que se forma un bucle de información reverberante.

La CE constituye la mayor entrada de información del DG a través de la vía perforante. A su vez, el DG conecta mediante sus fibras musgosas con las neuronas piramidales de CA3 del hipocampo y éstas últimas dirigen sus axones ramificados, denominados colaterales de Schaffer, a las neuronas de la región CA1. Ante este circuito de tres conexiones unidireccionales surgió el concepto de **circuito trisináptico** de la FH. Otra particularidad de este circuito es que se repite en cada sección transversal a lo largo de su eje septotemporal. Sin embargo, la conectividad intrínseca del hipocampo se va

dibujando cada vez más compleja, ya que también existen otras conexiones tanto en serie como en paralelo, por lo que el concepto de circuito trisináptico se ha convertido en una ligera simplificación (Amaral and Witter, 1995).

Conexión entorrino-hipocámpica: la vía perforante

Diversas regiones de la neocorteza (como por ejemplo la corteza de asociación. Ver más adelante apartado 4.3c) proyectan sobre la CE, que ejerce de vía de entrada de la información cortical a la FH (Witter and Amaral, 2004), con un importante potencial excitador sobre el hipocampo. Esta conexión recibe alternativamente el nombre de **vía perforante** porque sus fibras, una vez abandonan la CE, atraviesan la sustancia blanca, el haz angular, la capa de células piramidales del *subiculum* y la fisura hipocámpica (Amaral and Witter, 1995; van Groen et al., 2003). Es una proyección glutamatérgica, y su origen principal se encuentra en las neuronas piramidales de las capas II y III de la CE, aunque capas más profundas contribuyen en menor medida a esta vía (ver apartado 4.1). Estas neuronas establecen sinapsis con las células principales del DG y del hipocampo propio, de forma predominantemente ipsilateral en el ratón, aunque también existen conexiones contralaterales.

Por un lado, el **DG** recibe la proyección de las neuronas situadas en la capa II de la CE, finalizando la conexión en las dendritas de las células granulares de la capa molecular, aunque también pueden contactar con neuronas GABAérgicas. Aquellos axones procedentes del LEA inervan de forma muy específica el substrato om1 del DG, mientras que los que proceden del MEA terminan en el mml. No existe proyección recíproca hacia la CE.

Por otro lado, la proyección de la CE al **hipocampo propio** finaliza en la parte más distal de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3 y CA1. Así, los axones originados mayoritariamente en las capa III de CE quedan confinados en el estrato lacunosum-moleculare siguiendo un patrón topográfico característico: la LEA inerva principalmente la región correspondiente a la interfases de CA1-*subiculum* y CA2-CA3, mientras que MEA inerva el resto del estrato de CA1 (Amaral and Witter, 1995; Witter and Amaral, 2004; Witter, 2007).

Fibras musgosas

A pesar del nombre que recibe, el origen de las fibras musgosas no tiene lugar en las células musgosas del hilus sino que procede del único axón no mielinizado de cada una de las células granulares del DG. Dichos axones, conocidos como fibras musgosas, forman la conexión principal del DG con el hipocampo propio, ya que éstos establecen sinapsis específicas con las dendritas (situadas en el estrato lucidum) de las neuronas piramidales de la región CA3. Además, también pueden establecer sinapsis con las neuronas en cesto presentes en este estrato. A lo largo de su recorrido por el hilus, las fibras musgosas desarrollan proyecciones colaterales que establecen contactos con las células musgosas, así como con interneuronas y otros tipos celulares formando un extenso plexo en dicha zona (Amaral and Witter, 1995).

Las fibras colaterales de Schaffer

Todas las neuronas piramidales de la región CA3 proyectan ampliamente a distintas partes del hipocampo propio y fuera de él (Amaral and Witter, 1995; Freund and Buzsaki, 1996). La principal conexión es la conocida como *colateral de Schaffer o asociativa*. Se denomina asociativa porque se establece entre los niveles transversales del eje septotemporal del hipocampo, de forma ipsilateral. Así, los axones ramificados de neuronas piramidales de CA3 (colateral de de Schaffer) inervan esencialmente el estrato oriens y radiatum de CA1 del mismo hemisferio, mediante un patrón topográfico muy organizado (Witter and Amaral, 2004). Simultáneamente, las mismas neuronas de CA3 dan lugar a conexiones comisurales, al contactar con el hipocampo contralateral, en los estratos oriens y radiatum de las regiones región CA1, CA2 y CA3 (Blackstad, 1956).

4.3.b Proyecciones asociativas/comisurales

Dentro de este apartado se agrupan las proyecciones denominadas **asociativas**, que se establecen entre los niveles transversales a lo largo del eje AP del hipocampo y las conexiones **comisurales**, que son las que contactan con el hipocampo contralateral.

El **DG**, recibe en la parte más interna de su capa molecular (iml) proyecciones que parten exclusivamente de células musgosas del hilus, tanto de las situadas en el mismo hipocampo como en el contralateral (Blackstad, 1956; Witter and Amaral, 2004;

Zimmer, 1971). De hecho, una misma célula musgosa puede formar a la vez una proyección asociativa/comisural. La mayoría de estas células forman contactos excitadores con las dendritas más proximales de las células granulares, pero además contactan también con las interneuronas inhibitorias llamadas células en cesto (Seress and Ribak, 1984). Mediante este sistema se establece una retroalimentación positiva de la activación de las células granulares y también la posibilidad de regulación del proceso mediante la intervención de células en cesto (Amaral and Witter, 1995).

Como se ha mencionado anteriormente, en el **hipocampo propio** los axones de las neuronas piramidales de CA3, las llamadas fibras colaterales de Schaffer, inervan la región CA1 tanto de forma ipsi como contralateral, formando así conexiones asociativas y comisurales respectivamente. Por lo que respecta a las neuronas de la región CA1, a diferencia de las de la región CA3, no desarrollan gran cantidad de conexiones asociativas ni comisurales. Sólo algunas fibras de CA1, de camino hacia su diana principal, el *subiculum*, se ramifican y alcanzan el estrato oriens y la capa piramidal, donde se sitúan las dendritas basales de las neuronas piramidales (Amaral et al., 1991).

4.3.c. Conexiones extrínsecas: aferencias y eferencias de la formación hipocámpica

La principal entrada de información tiene lugar a través de la conexión entorrinal-hipocámpica (vía perforante). Esta información procede de regiones corticales y subcorticales (Amaral and Witter, 1995; Kerr et al., 2007) (Figura 26). A partir de una de estas regiones subcorticales, como es el núcleo medio del *septum* y núcleo de Banda Diagonal de Broca, se origina otra importante vía de entrada, la *proyección septo-hipocámpica* que inerva al DG y a las regiones CA1 y CA3. Esta inervación es mayoritariamente colinérgica, aunque también contiene proyecciones GABAérgicas, y además es recíproca. Asimismo, también se generan eferencias subcorticales, a partir de la FH que inervan regiones como amígdala, núcleo septal, núcleo accumbens, tálamo e hipotálamo, y eferencias corticales.

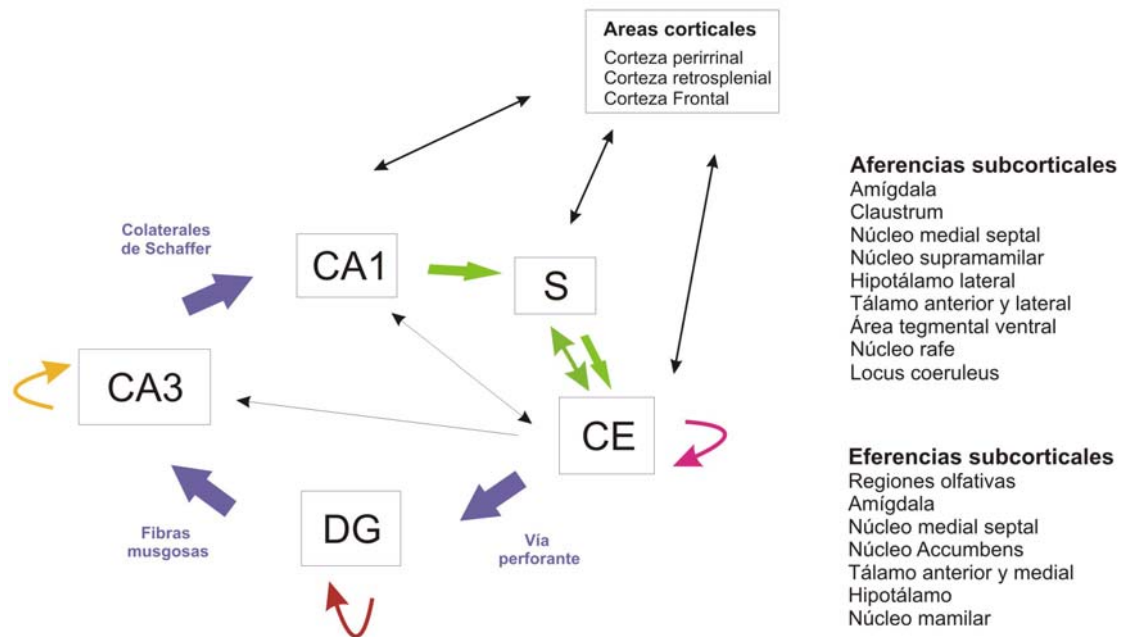


Figura 26. Conexiones intrínsecas y extrínsecas de la formación hipocámpica. *Adaptado de Amaral y Witter, 1995.*

4.4 Alteraciones que afectan a la formación hipocámpica

4.4.a Epilepsia de lóbulo temporal mesial (MTLE)

El término **epilepsia** abarca un conjunto de diversos síndromes, cuya característica común es la predisposición a padecer convulsiones espontáneas recurrentes. Estas convulsiones o crisis epilépticas son ataques repentinos de conciencia alterada, trastornos sensoriales, motores o cognitivos o un comportamiento inapropiado debido a una actividad neuronal anormal, ya sea por su excesiva intensidad o hipsincronía. El fenotipo de cada convulsión viene determinado por el origen de las descargas y su grado de dispersión en el cerebro (Elger and Schmidt, 2008; Engel, 1996).

A pesar de ser una de las enfermedades neurológicas más frecuente en humanos, aún están por determinar los mecanismos básicos que dan lugar a que circuitos neuronales normales desencadenen descargas eléctricas anormales. La teoría clásica defendía el desequilibrio entre la actividad inhibitora y la excitadora como origen de la crisis epiléptica. Actualmente, se piensa que esto es sólo una simplificación, y que estarían implicados diversos factores como aumento de transmisión excitadora, fallo en mecanismos inhibidores, cambios en las propiedades intrínsecas de las neuronas y conectividad exacerbada entre otros (Elger and Schmidt, 2008; Sloviter, 2005).

La epilepsia puede transmitirse genéticamente y no presentar lesiones estructurales en el cerebro ni déficits neurológicos, **epilepsia idiopática**, o puede ser el resultado de otras lesiones cerebrales (genéticas o adquiridas) como tumores, alteraciones vasculares y alteraciones en el desarrollo, en cuyo caso hablamos de **epilepsia sintomática** (Engel, 1996). Sin embargo, estas alteraciones no son *per se* epileptogénicas y cualquier estímulo que favorezca la hipersincronización y la excitabilidad es susceptible de originar descargas epileptiformes, como por ejemplo hipoxia, hipoglucemia, fiebre, abuso de alcohol o falta de sueño ((Elger and Schmidt, 2008) para revisión).

La forma más común de epilepsia sintomática en humanos es la **epilepsia de lóbulo temporal mesial** (MTLE) y se caracteriza por presentar crisis epilépticas focales complejas recurrentes en el hipocampo y corteza temporal (Engel, 1996). Aproximadamente, el 40% de los pacientes son resistentes al tratamiento farmacológico, por lo que la resección quirúrgica del foco epileptógeno es la terapia más efectiva para reducir la frecuencia de las crisis (de Lanerolle and Lee, 2005). Otro rasgo característico de la MTLE es su asociación con *esclerosis de hipocampo*, término que engloba distintos aspectos como atrofia y endurecimiento del hipocampo, pérdida neuronal y proliferación astrogliar. Aunque la pérdida neuronal afecta especialmente al hilus del DG y a la capa piramidal de las regiones CA1 y CA3, también se observa en el resto de estratos del hipocampo, así como en capas superficiales de la corteza entorrinal. También se asocian otros cambios morfológicos e histoquímicos en el DG, como son pérdida selectiva de interneuronas inhibitoras (positivas para Somatostatina y neuropéptido Y), *sprouting* axonal aberrante de neuronas granulares, reorganización de receptores de neurotransmisores y alteración en los sistemas de segundos mensajeros (de Lanerolle and Lee, 2005). La pérdida de determinadas poblaciones neuronales

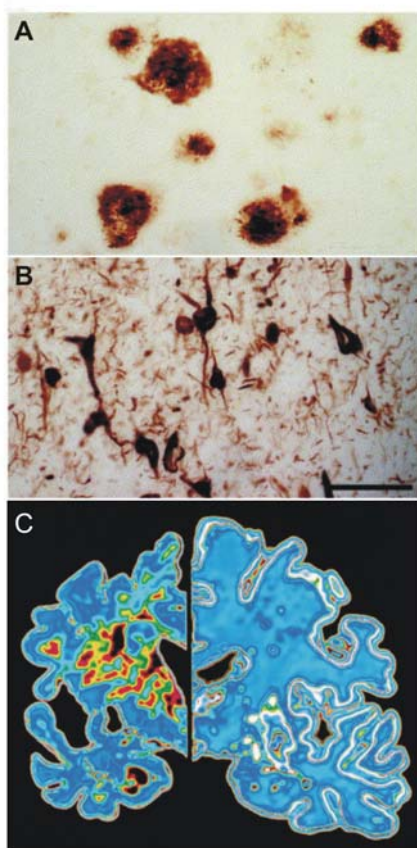
alteraría el equilibrio entre las células excitadoras e inhibitoras remanentes, lo que resulta en una desinhibición permanente de células granulares e hiperexcitabilidad de las mismas. En concreto, existen dos teorías para explicar este desequilibrio. Según la *hipótesis de excitación recurrente*, la hiperexcitabilidad es debida al *sprouting* aberrante de las fibras musgosas en respuesta a la pérdida de células musgosas del hilus y de neuronas piramidales de CA3 (Okazaki et al., 1999). En cambio, la *hipótesis de inhibición recurrente* sostiene que es la pérdida de interneuronas inhibitoras lo que causa la hiperexcitabilidad de las células granulares (Sloviter, 1992) (para revisión (Sharma et al., 2007)).

Desde el punto electrofisiológico y anatomopatológico, el hipocampo es la estructura más estudiada en la MTLE. Aunque se ha sugerido que tiene un papel importante en la epileptogénesis, existe una gran controversia acerca de si la esclerosis es la fuente primaria de la actividad epiléptica o si es sólo una consecuencia de los episodios epilépticos recurrentes. No hay duda de que en modelos animales, la esclerosis se produce como consecuencia de las frecuentes crisis, pero también es evidente que la resección quirúrgica del hipocampo es suficiente para prevenir futuras crisis (de Lanerolle and Lee, 2005; Sloviter, 2005). Sin embargo, las alteraciones histopatológicas no son lo suficientemente homogéneas como para identificar un conjunto inequívoco de lesiones hipocámpicas responsables de la epilepsia. En este sentido, cobra fuerza la idea de que, como ha ocurrido en los estudios sobre animales, la esclerosis del hipocampo es una patología secundaria al proceso epileptógeno.

Estas modificaciones morfológicas e histoquímicas que se observan en el hipocampo esclerótico suponen grandes cambios de reorganización sináptica y plasticidad, por lo que se ha llegado a pensar en la participación de moléculas de guía axonal o factores reguladores del crecimiento axonal en la formación de las mismas.

4.4.b Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's Disease*) es la enfermedad neurodegenerativa que más se relaciona con la edad y la mayor causa de demencia en la vejez (50-60% de los casos). Fue descrita por primera vez por **Alois Alzheimer** en 1906 tras estudiar el cerebro de una mujer de 55 años (Augusta D.) que presentaba pérdida de memoria, alucinaciones, desorientación temporoespacial, paranoias y trastornos en la conducta y lenguaje. La descripción histopatológica *post mortem* incluía la presencia de unos depósitos extracelulares en determinadas áreas del cerebro (y que ahora conocemos como placas amiloides) y de depósitos intraneuronales de apariencia filamentosa (ovillos neurofibrilares). Estas dos características representan los rasgos distintivos de la enfermedad y su observación durante el examen *post mortem* es todavía necesaria para un diagnóstico concluyente de la AD (para revisión (LaFerla and Oddo, 2005)) (Figura 27A-B).



A nivel macroscópico, el cerebro de los enfermos de AD presenta una atrofia, sobretodo de las regiones implicadas en el aprendizaje y la memoria, incluyendo la corteza (temporal, parietal y frontal), el hipocampo y la amígdala. Presentan además una disminución del peso y volumen cerebral y del espesor de la corteza (especialmente de la sustancia gris) lo que origina una mayor separación entre las circunvoluciones, un aumento de la profundidad de los surcos y dilatación de los ventrículos (Figura 27C). De hecho, Alois Alzheimer ya se refirió a este trastorno como “*una enfermedad específica de corteza cerebral*”. Esta atrofia es debida principalmente a la elevada tasa de muerte neuronal.

Figura 27. Alteraciones histopatológicas en el cerebro de AD. **A)** Microfotografía de placas amiloides en el cerebro de AD, visualizadas mediante inmunotinción con anticuerpo anti- $A\beta_{42}$. **B)** Microfotografía de ovillos neurofibrilares, visualizados mediante inmunotinción con anticuerpo anti-PHF1. Hay que señalar la elevada inmunoreactividad en el compartimento somato-dendrítico, característico de la distribución anómala de la proteína Tau. Escala: 125 μm en A y 62.5 μm en B. (Adaptado de Laferla y Oddo, 2005). **C)** Neuroimagen por PET (tomografía de emisión de positrones) que muestra la atrofia de cerebro afectado por AD (izquierda) en comparación con cerebro sano (derecha). Adaptado de Pasiaka (Science photo library/ Photo Researchers, Inc).

Además de estas alteraciones, en el cerebro afectado por AD también se produce pérdida de conexiones sinápticas, declive en la síntesis de algunos neurotransmisores (por ej., dopamina, noradrenalina y acetilcolina) y cuerpos de Lewy (agregados de proteína α -sinucleína) en algunos casos.

En cuanto a los depósitos extracelulares, aunque fueron descritos por primera vez en 1907, no fue hasta la década de 1980, cuando se conoció su naturaleza química. El elemento fundamental que los compone es el **péptido β -amiloide** ($A\beta$) que se origina a partir del procesamiento proteolítico de la **proteína APP** (del inglés *Amyloid Precursor Protein*) (Glennner and Wong, 1984). La proteína APP es una proteína transmembrana que se encuentra en terminales nerviosos y puede presentar dos vías de procesamiento: vía amiloidogénica y vía no amiloidogénica (Figura 28).

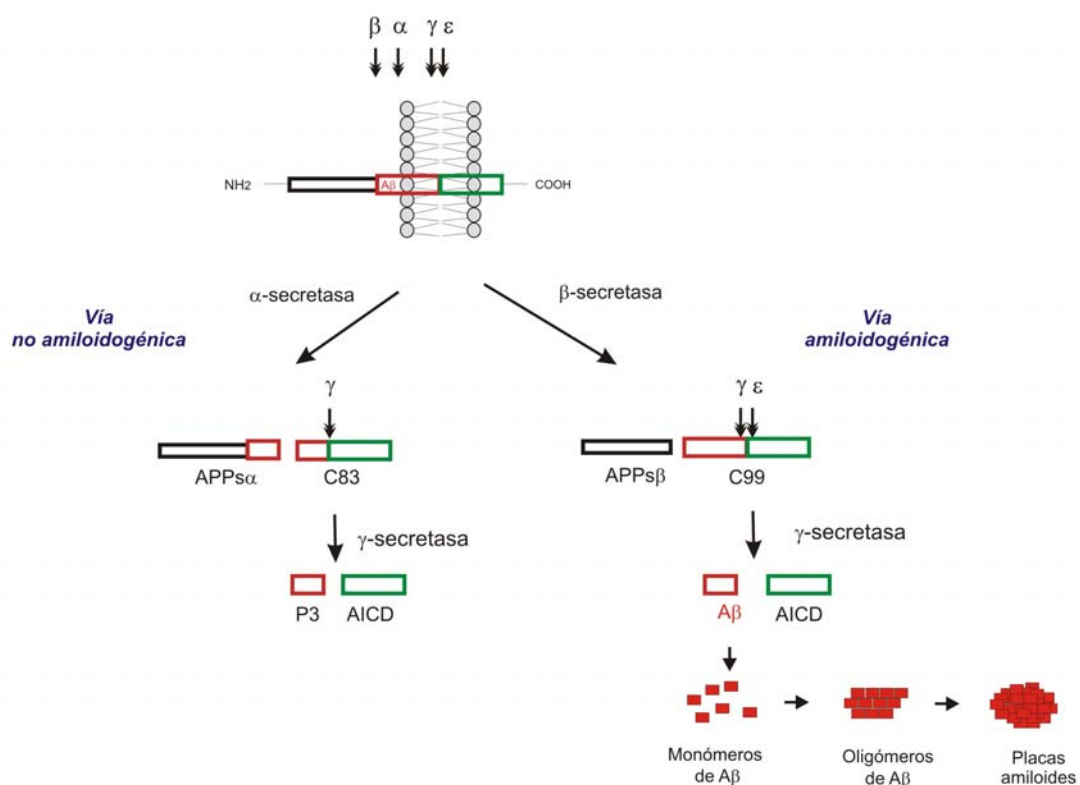


Figura 28. Vías de procesamiento de APP.

Vía no amiloidogénica. La enzima α -secretasa escinde a la proteína transmembrana APP en los residuos 16-17, liberando un fragmento N-terminal extracelular soluble, APPs α , y un fragmento C-terminal de 83 residuos, C83. El fragmento C83 es procesado por el complejo enzimático γ -secretasa que libera al fragmento AICD (Δ APP intracelular domain) y al péptido p3, que aunque se deposita en placas difusas es considerado como no amiloidogénico.

Vía amiloidogénica. Para generar el péptido A β , la proteína APP debe ser escindida en primer lugar por la enzima β -secretasa, conocida como BACE-1 (β -site APP-cleaving enzyme). Este corte genera un fragmento N-terminal soluble, APPs β , y el fragmento amiloidogénico C-terminal, C99. Este fragmento será procesado por el complejo enzimático γ -secretasa para liberar AICD y el péptido A β . Los monómeros de A β se irán agregando, formando oligómeros y en último término placas amiloides. Adaptado de Laferla y Oddo, 2005.

Cuando APP es escindida por la enzima α -secretasa, siguiendo la **vía no amiloidogénica**, el producto resultante es un péptido soluble, sAPP α , con características neuroprotectoras y neurotróficas. Cuando predomina la **vía amiloidogénica**, se produce la escisión consecutiva de APP por parte de las enzimas β -secretasa y del complejo γ -secretasa, generándose entonces el péptido A β que es liberado al exterior. En individuos sanos, el péptido A β se produce de forma constitutiva durante el metabolismo celular a partir del procesamiento proteolítico de la proteína APP y se encuentra en pequeñas cantidades en forma de monómeros solubles circulantes en sangre y fluido cerebroespinal. Sin embargo, cuando los niveles aumentan significativamente, por sobreproducción o por defectos en los mecanismos de eliminación, el péptido se autoensambla formando oligómeros, protofibrillas, fibrillas y por último placas amiloides. Entre éstas se distinguen las placas neuríticas (con núcleo denso de péptido A β y presencia de neuritas distróficas) y las placas difusas (sin neuritas distróficas). Aunque la mayor parte de estos péptidos poseen una longitud de 40 residuos (A β ₄₀), también se produce, aunque en menor medida (aproximadamente del 10%) una variante de 42 residuos (A β ₄₂). Ésta última es más hidrofóbica y tiene más tendencia que A β ₄₀ a formar fibrillas, por lo que es la isoforma que se encuentra en las placas (para revisión (Mattson, 2004)).

En cuanto a los depósitos intracelulares, su principal componente es la **proteína microtubular tau en su forma hiperfosforilada** (Grundke-Iqbal et al., 1986) (Figura 27B). La proteína tau normal forma los "puentes" que mantienen correctamente unidos los microtúbulos que conforman el citoesqueleto neuronal. Sin embargo, en AD se produce una hiperfosforilación anómala de esta proteína que hace que pierda afinidad por la tubulina, por lo que se desensambla el citoesqueleto y se forman agregados intracelulares que reciben el nombre de **ovillos neurofibrilares** (NFTs, del inglés *NeuroFibrillary Tangles*). La falta de un citoesqueleto funcional obstruye el tráfico celular contribuyendo a la muerte celular. Los dos tipos de lesiones (placas y ovillos neurofibrilares) se pueden encontrar también en el cerebro de ancianos sanos, y lo que en realidad marca el diagnóstico histopatológico es su cantidad y topografía, correlacionándose su número y densidad con la intensidad de la demencia en estos pacientes. Sin embargo, algunos investigadores mantienen que la presencia de estos agregados en individuos sanos es un indicador del comienzo de la enfermedad.

La **hipótesis de la cascada amiloide** (Hardy and Higgins, 1992) sostiene que es la agregación del péptido A β , como consecuencia del desequilibrio entre su síntesis y su eliminación, la causa del resto de alteraciones celulares y por tanto, el evento desencadenante de la enfermedad. Los oligómeros pueden directamente alterar la función sináptica e inhibir la LTP y otras cascadas de señalización, además de activar la microglía y astrogía. Esta activación glial genera procesos inflamatorios y estrés oxidativo que acaban provocando la formación de los ovillos y la interrupción del tráfico celular, provocando en último término la muerte neuronal. También los oligodendrocitos resultan gravemente dañados, lo que provoca rotura de las vainas de mielina y por tanto, alteración en la conducción nerviosa. Sin embargo, existe cierta controversia respecto a esta hipótesis, ya que algunos investigadores argumentan que la acumulación del péptido sólo es un efecto secundario a la muerte neuronal o un mecanismo protector para concentrar y aislar oligómeros del espacio extracelular (para revisión (Hardy, 2009)).

Etiología y epidemiología. Según la edad de inicio y la etiología podemos distinguir dos tipos de enfermedad: FAD y AD esporádica. Los dos tipos de enfermedad presentan los mismos rasgos histopatológicos y déficits neurológicos.

-**FAD** (del inglés *familial alzheimer's disease*) es hereditaria y constituye solo entre el 1-5 % de los casos. Se hereda por transmisión autonómica dominante de mutaciones en los genes **APP** (cromosoma 21), **presenilina 1** (cromosoma 14) y **presenilina 2** (cromosoma 1) y la aparición de los síntomas se produce de forma temprana (antes de los 65 años). Estas mutaciones favorecen la vía amiloidogénica, ya sea por mutaciones en la secuencia de APP o en las proteínas que generan el péptido (por ej., en presenilinas, que forman parte del complejo γ -secretasa)

-El resto de los casos son **AD esporádica o compleja**, con una etiología multifactorial con diversos factores de riesgo, que incluyen la predisposición genética (parientes de primer grado que presentan la enfermedad o mutación en el alelo $\epsilon 4$ del gen APOE), la edad (es más frecuente a partir de los 65 años, a partir de los cuales el riesgo se duplica cada 5 años) y factores de riesgo exógenos, ambientales, que parecen favorecer su desarrollo, como ocurre con los traumatismos craneoencefálicos graves y enfermedades vasculares (Blennow et al., 2006).

Avance/progresión de la enfermedad. La acumulación de placas y ovillos, comienza muchos años antes de la aparición de los síntomas de la AD. Durante este periodo presintomático, aparentemente no hay síntomas porque las neuronas que sobreviven compensan dicha pérdida neuronal, y sólo cuando esta pérdida es de más del 80 %, los síntomas se hacen evidentes, momento en el cual el proceso ya es irreversible.

Sorprendentemente, los depósitos empiezan a acumularse en áreas muy determinadas del cerebro, como corteza temporal, hipocampo y amígdala, y se van extendiendo progresivamente siguiendo un patrón bilateral perfectamente predecible, hasta alcanzar todas las regiones de la corteza. Este avance predecible de la enfermedad tiene lugar de forma inversa al proceso de mielinización. Éste empieza en áreas motoras y sensoriales primarias (corteza frontal y parietal) acabando en áreas límbicas (hipocampo y corteza entorrinal) alrededor de los 40-50 años de edad. Precisamente, son estas áreas, que poseen envolturas mielínicas de menor grosor y, por tanto, más vulnerables a cualquier lesión, especialmente al daño oxidativo, las primeras en presentar los daños celulares desencadenantes de la enfermedad (Braak and Braak, 1996) (Figura 29).

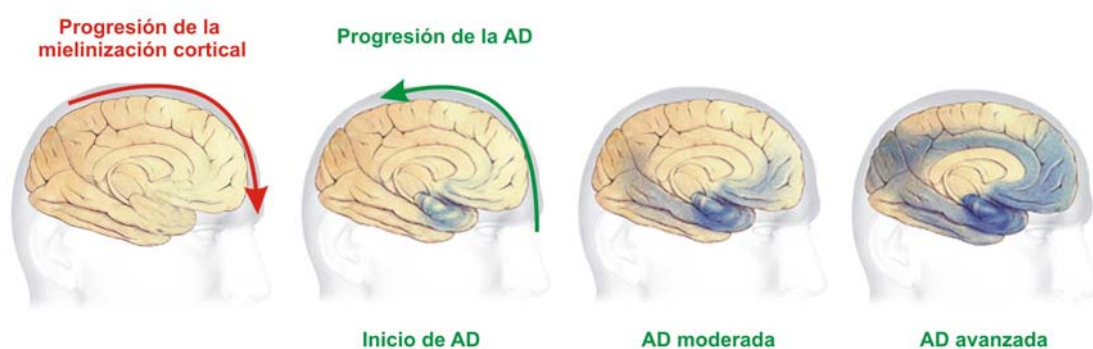


Figura 29. Progresión del avance de AD en relación al proceso de mielinización cortical. La mielinización cortical comienza en corteza frontal y parietal y finaliza en áreas límbicas, como hipocampo y corteza entorrinal. Por el contrario, el péptido A β comienza a acumularse en áreas límbicas, extendiéndose los depósitos por la corteza mediante un patrón predecible e inverso al proceso de mielinización. *Adaptado de alz.org.*

Como ya se ha mencionado anteriormente, los oligodendrocitos son particularmente reactivos y vulnerables tanto al estrés oxidativo como a las citoquinas inflamatorias y excitotoxicidad que se derivan de la acumulación de péptidos A β . De hecho, se ha correlacionado la degeneración de oligodendrocitos con la pérdida de tractos axonales

mielinizados en AD. Es de esperar que esta pérdida de oligodendrocitos y de mielina tenga graves efectos no sólo en la función neuronal (comprometiendo la conducción del impulso axonal) sino también en la viabilidad neuronal (ya que los oligodendrocitos proveen de diversos factores tróficos a las neuronas) (Bartzokis, 2004). El hecho de que el avance de la enfermedad recapitule, aunque de forma inversa, el proceso de mielinización sugiere un importante papel de la mielina, y por tanto, de los oligodendrocitos, en el desarrollo de la enfermedad.

OBJETIVOS

Las proteínas inhibitorias asociadas a mielina, Nogo-A, OMgp o MAG se unen al complejo Nogo receptor, formado por NgR1, Lingo-1 y p75^{NTR}/TROY, desencadenando una señalización intracelular que conlleva la inhibición de la regeneración axonal tras lesión. Sin embargo, los estudios publicados en el momento de iniciarse el presente trabajo sugerían que, tanto los ligandos como los componentes del complejo receptor podrían ejercer otras funciones no relacionadas con la inhibición de la regeneración axonal en el adulto. Por ejemplo, Nogo-A había sido implicado en neurogénesis y formación de tractos axonales (Tozaki et al., 2002; Mingorance et al., 2004; Huber et al., 2002; Richard et al., 2005). Igualmente, p75^{NTR} era conocido desde hacía años por su función como receptor de baja afinidad para NGF y por su participación en vías de señalización de supervivencia y muerte celular (Chao, 1994), y TAJ/TROY había sido identificado como miembro de la superfamilia TNFR, capaz de mediar muerte celular independiente de caspasa 3 (Eby et al., 2000). Además, aunque se acababa de describir que Lingo-1 era miembro esencial del complejo receptor para las MAIPs (Mi et al., 2004), no se había demostrado si los tres componentes propuestos para formar el complejo receptor compartían el mismo patrón de expresión, ni tampoco si podían coexistir en el mismo tipo celular y compartimento. De hecho, todos los resultados que apoyaban esta teoría habían sido realizados en células cotransfectadas con las tres moléculas, por lo que se desconocía si la formación de complejo tenía lugar *in vivo* en condiciones fisiológicas normales. Con todo esto, era razonable considerar que se necesitaba de un estudio detallado del patrón de expresión de Lingo-1 y de su distribución celular, para poder definir mejor su función.

Por otra parte, existían ciertas discrepancias en cuanto al tipo celular en el que se expresaba OMgp. Sólo existían tres artículos que trataran la cuestión y mientras que unos sostenían una localización exclusiva en oligodendrocitos (Mikol and Stefansson, 1988), otros proponían una expresión neuronal (Habib et al., 1998b; Hunt et al., 2002a). Estas diferencias son muy similares a las observadas años atrás en cuanto a la expresión neuronal y oligodendroglial de Nogo-A (Mingorance et al., 2004). Además, todos los estudios de expresión descritos hasta la fecha se centraban en estadios postnatales y adultos, pero no en estadios embrionarios (Vourc'h et al., 2003), y además sólo analizaban los niveles de ARNm de OMgp y no de su proteína. Debido a estas discrepancias, uno de nuestros objetivos fue profundizar en la distribución celular y

regional de la proteína OMgp a lo largo del desarrollo y determinar posibles funciones adicionales.

Por último, algunos estudios habían descrito la implicación de algunas proteínas de la mielina, como Nogo-A, además de otros Reticulones, en diversas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, se había mostrado que Nogo-A aumentaba, a nivel de ARNm y de proteína, en el hipocampo de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (Bandtlow et al., 2004) y también aumentaba en pacientes de esclerosis múltiple, tanto en extractos de cerebros como en suero y líquido cefalorraquídeo (Reindl et al., 2003; Satoh et al., 2005). Asimismo, también se observó un aumento de Nogo-A en biopsias de músculo esquelético de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica y en el modelo animal de esta enfermedad (Dupuis et al., 2002), y un aumento de ARNm en corteza cerebral de pacientes con esquizofrenia (Novak et al., 2002). Además, también se había descrito que RTN3 y NogoB interaccionaban con la enzima β -secretasa, lo que conllevaba una disminución en la síntesis de péptido A β (He et al., 2004). Estas últimas evidencias llevaron a plantearnos la posibilidad de que la expresión de Nogo-A pudiera estar alterada en AD.

Por tanto, los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

Objetivo 1. Estudiar el patrón de expresión de la proteína Lingo-1/LERN1 en el SNC de ratón.

- Describir el patrón de expresión de Lingo-1 en SNC de ratón durante el desarrollo y en estadio adulto
- Analizar la coexistencia de los componentes del complejo Nogo receptor *in vivo*
- Estudiar la función del dominio C-terminal de la proteína Lingo-1 para el desarrollo de su función

Objetivo 2. Estudiar del patrón de expresión de la proteína OMgp en SNC de ratón.

- Describir del patrón de expresión de OMgp en el telencefalo de ratón durante el desarrollo y en estadio adulto

- Analizar la localización subcelular de OMgp
- Estudiar la función de OMgp en el desarrollo de la conexión tálamo-cortical.

Objetivo 3. Estudiar el patrón de expresión de la proteína Nogo-A en la formación hipocámpica humana durante el envejecimiento normal y en la enfermedad de Alzheimer.

RESULTADOS

Análisis del patrón de expresión de la proteína Lingo-1/Lern1 durante el desarrollo del cerebro de ratón: Interacción de su dominio intracelular con Myt11

Franc Llorens, Vanesa Gil, Susana Iraola, Laura Carim-Todd, Eulàlia Martí, Xavier Estivill, Eduardo Soriano, José Antonio del Río y Lauro Sumoy.

Resumen

Lingo-1, también conocido como LERN1, es uno de los componentes del complejo Nogo receptor que media la señalización intracelular en respuesta a las proteínas inhibitoras asociados a mielinas (MAIPs): Nogo-A, MAG y OMgp. La señalización a través de este complejo no solo está implicada en la inhibición de la regeneración axonal tras lesión, si no que se ha descrito que también interviene en maduración funcional neuronal. Mediante ratones deficientes para Lingo-1, se ha demostrado que Lingo-1 está implicado en funciones de diferenciación de oligodendrocitos durante el desarrollo nervioso, y que el tratamiento con antagonistas de Lingo-1 pueden mejorar la regeneración axonal tras lesión en animales adultos. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito el patrón de expresión de la proteína Lingo-1 en relación a los otros componentes del complejo. En el presente trabajo, se muestra la coexistencia de Lingo-1, NgR1, p75 y TROY en el cerebro de ratón durante una ventana temporal postnatal muy definida. También hemos determinado la distribución de Lingo-1 en determinadas subpoblaciones neuronales, pero no en oligodendrocitos mielinizantes maduros. Sorprendentemente, Lingo-1 se expresa en estadios tempranos del desarrollo en los cuales no se expresa NgR1, lo que refuerza la idea de que Lingo-1 pueda participar en otras funciones en neuronas en desarrollo diferentes a la maduración oligodendrogial o a la inhibición de la regeneración en el adulto. Finalmente, mostramos que el dominio intracelular de Lingo-1 contribuye a la señalización y además interacciona con la proteína postmitótica neuronal Myt11, sugiriendo que Lingo-1 puede regular la actividad de este factor de transcripción al afectar a su localización subcelular.

Developmental Analysis of Lingo-1/Lern1 Protein Expression in the Mouse Brain: Interaction of its Intracellular Domain with Myt1l

Franc Llorens,¹ Vanesa Gil,^{2,3,4} Susana Iraola,¹ Laura Carim-Todd,^{1,5†} Eulàlia Martí,⁶ Xavier Estivill,⁶ Eduardo Soriano,^{3,4} José Antonio del Río,^{2,3,4*} Lauro Sumoy^{1*}

¹ Bioinformatics and Genomics Program, Center for Genomic Regulation (CRG), UPF, Barcelona 08003, Spain

² Bases Cel·lulars i Moleculares de la Neurodegeneració i Neuroreparació, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona 08028, Spain

³ Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain

⁴ Neurobiologia del Desenvolupament i la Regeneració, Institut de Recerca Biomèdica i Departament de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona, Barcelona 08028, Spain

⁵ Mouse Cancer Genetics Program, Neural Development Group, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Frederick, Maryland 21702

⁶ Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation (CRG), UPF, Barcelona 08003, Spain

Received 31 July 2007; revised 30 October 2007; accepted 24 November 2007

ABSTRACT: Lingo-1 (also known as Lern1) is a component of the Nogo receptor complex that mediates intracellular signaling in response to myelin associated inhibitors (MAIs): NogoA, MAG, and Omgp. Signaling through Nogo receptor extends to more than its well known role in preventing axon regeneration after lesion in the CNS, being implicated in neuronal functional maturation. Using Lingo-1-deficient mice, it has been

demonstrated that Lingo-1 plays relevant roles in oligodendrocyte differentiation during brain development, and that treatment with Lingo-1 antagonists can improve axon regeneration after lesion in adult mice by decreasing MAI mediated signaling. However, a detailed description of the pattern of expression of Lingo-1 protein in correlation with the other partners of Nogo receptor is missing. Here, we show that components of the

This article contains supplementary material available via the Internet at <http://www.mrw.interscience.wiley.com/suppmat/1932-8451/suppmat/>

*The two principal investigators contributed equally to the work.

†Present address: Mouse Cancer Genetics Program, Neural Development Group, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Frederick, Maryland 21702, USA.

Correspondence to: L. Sumoy (lauro.sumoy@crg.es).

Contract grant sponsor: Fundació La Marató de TV3; contract grant number: 013110.

Contract grant sponsor: Spanish Ministry for Science and Technology; contract grant numbers: SAF2003-05266, SAF2004-06976, BFU2006-13651, SAF2005-00171.

Contract grant sponsor: Generalitat of Catalunya; contract grant numbers: SGR2005-00382, SGR2005-00830, SGR2005-00008, SGR2005-00404.

Contract grant sponsor: Spanish Ministry of Health (FIS); contract grant number: CB06/02/0058.

Contract grant sponsors: Spanish Ministry of Science and Technology (Ramon y Cajal contract to L.S.), Spanish Ministry of Education (Juan de la Cierva contract to F.L.).

© 2008 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 10 January 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/dneu.20607

Nogo receptor complex, Lingo-1, NgR1, p75, and TROY coexist in mouse brain in a defined time window only at later postnatal stages. We have also determined the Lingo-1 distribution showing expression in particular subsets of neurons, but not in myelinating mature oligodendrocytes. Surprisingly, Lingo-1 is expressed at early developmental stages without NgR1, which supports the notion that Lingo-1 may participate in other activities in developing neurons different from oligodendrocyte mat-

uration or axon extension inhibition in the adult. Finally, we propose that the intracellular domain of Lingo-1 contributes to signaling and show that it interacts with the postmitotic neuronal specific zinc finger protein Myt11, suggesting that Lingo-1 may regulate Myt11 transcription factor activity by affecting its subcellular localization. © 2008 Wiley Periodicals, Inc. *Developmental Neurobiology* 68: 521–541, 2008

Keywords: Lrrn6A; Lingo-1; p75; NgR1; Myt11

INTRODUCTION

There are active components in myelin that prevent axons from regenerating after injury termed the myelin associated inhibitory proteins (MAIs). Three MAIs: NogoA (*Rtn4*), Omgp (*Omg*), and MAG (*Mag*) have been identified that act via the same receptor, the Nogo receptor (NgR1, *Rtn4r*) (Fournier et al., 2001; Yamashita et al., 2005) or its paralogues (*Rtn4rl1* and *Rtn4rl2*) (Barton et al., 2003; Lauren et al., 2003; Pignot et al., 2003; Venkatesh et al., 2005) to prevent axon regeneration. While NgR1 is a GPI anchored protein and therefore is unable to transduce signal to the cytoplasm, it has been shown to form a complex either with p75 (*Ngfr*) (Wang et al., 2002; Wong et al., 2002) or TAJ/TROY (*Tnfrsf19*) (Park et al., 2005; Shao et al., 2005), which can signal by activating RhoA (Yamashita and Tohyama, 2003; Park et al., 2005; Shao et al., 2005). On the basis of changes in gene expression and association to known partners, these receptors have been also implicated in activity dependent plasticity (McGee et al., 2005) and neurodegenerative disease (Strittmatter, 2002; Karnezis et al., 2004; Teng and Tang, 2005; Gil et al., 2006; Jokic et al., 2006; Park et al., 2006). While MAIs and their receptors are widely expressed in the adult central nervous system and increasing knowledge is reported about their functions, little is known about their roles during development. For example, NogoA was only implicated in preventing axon regeneration after lesion or in neurodegenerative diseases (Strittmatter, 2002; Karnezis et al., 2004; Teng and Tang, 2005; Gil et al., 2006; Jokic et al., 2006; Novak and Talerico, 2006; Park et al., 2006). However, recent studies have reported NogoA involvement in cell migration and axonal fasciculation during brain development (Mingorance et al., 2004; Mingorance-Le Meur et al., 2007). The same happens with other MAIs such as Omgp with key roles in the formation of nodes of Ranvier (Nie et al., 2006).

The *Lrrn6A* gene, encoding the Lingo-1 protein, also termed Lern1, is the third essential component of the Nogo receptor complex (Carim-Todd et al., 2003; Carim-Todd, 2004; Mi et al., 2004). Lingo-1 is a type

I transmembrane protein with 11 leucine rich repeats and an immunoglobulin domain in the extracellular portion, and a short intracellular tail. Its amino acid sequence is extremely well conserved among vertebrates (Carim-Todd et al., 2003; Mi et al., 2004). The crystal structure of the extracellular portion has been shown to form a tetramer (Mosyak et al., 2006). It has been proposed that Lingo-1 has a pivotal role in repressing oligodendrocyte differentiation, since Lingo-1-deficient mice showed premature myelination (Mi et al., 2005). In addition, extracellular blockade of Lingo-1 function is able to overcome the myelin inhibitory activity in the spinal cord that prevents axonal regeneration after lesion in rats (Ji et al., 2006). More recently, Lingo-1 inhibition has been shown to improve dopaminergic neuron activity in a model of Parkinson's disease (Inoue et al., 2007) and to promote spinal chord remyelination in an experimental model of auto-immune encephalitis (Mi et al., 2007). Finally, the Lingo-1 protein has been identified as part of the APP interactome in brain tissue and its downregulation correlates with a decrease in β A release (Bai et al., 2007).

Gene expression studies have shown that Lingo-1 mRNA is expressed almost exclusively in the CNS throughout embryonic and postnatal stages, with regional differences (Carim-Todd et al., 2003; Mi et al., 2004; Mi et al., 2005; Okafuji and Tanaka, 2005; Park et al., 2005; Bai et al., 2007; Barrette et al., 2007; Lee et al., 2007). However, it is relevant to determine in detail the distribution of Lingo-1 protein in the CNS to evaluate its ability to interact *in vivo* with the other components of the Nogo receptor complex: NgR1 and p75 (or TROY). With this in mind, in this study we conducted a detailed analysis of the Lingo-1 protein expression pattern in the developing and adult mouse brain. Besides confirming the existence of complexes *in vivo* biochemically, we also show that Lingo-1 is expressed in brain regions and subcellular compartments not overlapping with other components of the Nogo receptor complex, which point to additional roles of Lingo-1 during development and in the adult. In addition, we have investi-

gated the role of the C-terminal domain of Lingo-1, which has been shown to be essential for its function, by screening for proteins that interact with this domain. We demonstrate for the first time that the Myt1l transcription factor is able to interact with the C-terminal domain of Lingo-1. This transcription factor has been shown to be a very early marker of post-mitotic neuronal differentiation and its protein intracellular location appears to be modulated during spinal cord regeneration. On the basis of this interaction and what is already known about Lingo-1 function, we propose a relevant role for Myt1l as a target for Lingo-1 mediated intracellular signaling in neurons.

METHODS

Antibodies

Anti-Lingo-1 (1:1000) and anti-ATPase Na/K (1:1000) were from Upstate, anti-tubulin (1:10,000), anti-FLAG (1:2000) and anti-SNAP-25 (1:5000) were from Sigma. Anti-calretinin (1:1000) was from Bender Med Systems and anti-p75 (1:1000) was from Promega. Anti-NgR1 (1:500) and goat anti-Lingo-1 (1:500) were from R&D Systems and Anti-lamin B (1:2000) was from Santa Cruz. Anti-calbindin D-28K (1:2000) and anti-parvalbumin (1:500) were from Swant Antibodies. Anti-TNFRSF19 (anti-TAJ-TROY) (1:5000) was from Lifespan Biosciences. Anti-Lem-p1331 antibody was raised in rabbit against the extracellular Lingo-1 peptide RSYSPDWPHQPKNKTF. Anti-serum was purified by Protein-A chromatography (Amersham-Pharmacia), lyophilized, resuspended in PBS and used at a 1:200 dilution in immunofluorescence and immunocytochemistry experiments. Rabbit anti-Myt1l (1:1000) was originally described by Kim et al., 1997.

Northern Blot

For detection of the mouse Lingo-1 transcript, a mouse multiple-tissue Northern blot (Clontech, BD Biosciences) was hybridized with a probe obtained by excising the 983 bp insert of the IMAGE cDNA clone 1617960 with *NotI* and *EcoRI*. The probe was radioactively labeled using a random priming Rediprime II labeling kit according to the manufacturer's instructions (Amersham-Pharmacia). Hybridization of blots was performed overnight at 65°C in ExpressHyb solution (Clontech, BD Biosciences) and washed thoroughly at 68°C in 0.2x SSC with 0.5% SDS to avoid nonspecific signals. Control β -actin was that provided with the kit.

Immunoblotting and Immunocytochemistry on Cell Cultures

For Western blotting, transfected and nontransfected cell lines as well as neural tissues were washed twice with cold PBS and lysed on ice for 10 min with Lysis Buffer A

(50 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM PMSF and Protease Inhibitors). After centrifugation at 14,000g for 20 min, supernatants were mixed with SDS-PAGE sample buffer, boiled, and subjected to 8–10% SDS-PAGE. Gels were transferred onto PVDF membranes and processed for specific immunodetection using the antibodies at the dilutions indicated above.

For immunocytochemistry assays on cell cultures indicated cell lines were grown on glass coverslips, and transfected with ptag4A-FLAG vectors with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 24 h, cells were rinsed twice with cold PBS and fixed with Methanol/Acetone (1:1) for 5 min at –20°C. After 1 h blocking with 10% FCS-PBS, coverslips were incubated overnight at 4°C with anti-Lem-p1331 and anti-FLAG antibodies in 1% FCS-PBS. Successive washes with 1% FCS-PBS were carried out to reduce nonspecific reactivity and were followed by a 45 min incubation with Alexa Fluor-488 and Alexa Fluor-568-coupled secondary antibodies (Molecular Probes) in 1% FCS-PBS. Cells were washed in 1% FCS-PBS before mounting coverslips with Vectashield containing 150 ng/mL DAPI and analyzed on a LEICA DMR microscope.

Primary Cell Culture

A primary culture of mouse cerebellar granule neurons (CGNs) was prepared from 5-day-old mice. Cerebella were isolated, cut into small pieces and then trypsinized at 37°C. The dissociated cells were seeded at a density of $0.25 \times 10^6/\text{cm}^2$ into a poly-D-lysine coated culture dish (12-mm diameter). Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FCS (DMEM-FCS) containing 25 mM KCl at 37°C in humidified 5% CO₂. After 24 h, medium was refreshed with DMEM-FCS containing 25 mM KCl supplemented with 10 μM cytosine arabinoside (Ara-C) and cultured for 7 days.

Cell Culture and Transfection

Cell lines were grown in DMEM with 4.5 g/L glucose supplemented with 10% FCS. Incubation was at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For cell transfection, cells were seeded at 0.5×10^6 cells/mL and transfected the next day with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 4 h, the complete medium was reestablished overnight and cells were lysed as described before.

Plasmid Construction

Full length Lingo-1-FLAG was cloned as described before in the mammalian expression vector ptag4A (Carim-Todd et al., 2003). The C-terminal deletion mutant Lingo-1 (1-587)-FLAG was obtained by subcloning from the full-length construct using the *EcoRI* and *SaII* sites of the poly-linker. Sequence was confirmed by DNA sequencing.

Subcellular Fractionation

Neuroblastoma N1E-115 and CGN subcellular fractions were obtained using the Qproteome cell compartment kit (Qiagen), which enables the sequential isolation of proteins associated with the cytosol, membranes and nucleus from cell lysates. Appropriate markers were used to ensure correct isolation of cell compartments.

For density gradient subcellular fractionation, 7 days postnatal mouse brains were disaggregated with a Potter homogenizer (10 strokes at 600 rpm) in ice-cold buffer containing 0.32M sucrose, 10 mM Hepes (pH 7.4), 1 mM PMSF and 1 mM EGTA, (1:10, w/v). The brain homogenate was centrifuged for 2 min at 2,000g and the post-nuclear supernatant was collected and subfractionated by centrifugation on 13 mL of a 0.4–2.0M discontinuous sucrose gradient (nine layers of 0.2M increments) at 33,000 rpm for 3 h in a SW41 rotor (Beckman Instruments). Aliquots of 0.4 mL were extracted from top to bottom of the gradient. Equal volumes of every fraction were mixed with SDS-PAGE sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and Western blot, using the indicated antibodies.

Biotinylation Assay of Membrane Proteins

CGN neurons grown on poly-D-lysine-coated dishes were washed three times with ice-cold PBS and incubated 15 min with 1.0 mg/mL EZ-link sulfo-*N*-hydroxysulfosuccinimide-*S*-*S*-biotin (Pierce) in cold PBS, pH 8.0 (or with buffer without biotin), with gentle agitation at 4°C. Cells were washed twice and incubated with a quenching buffer (192 mM glycine and 25 mM Tris in PBS) for 10 min. Next, cells were rinsed three times and scraped in cold PBS, pelleted down, and homogenized in lysis buffer as mentioned above. Supernatants were then incubated with 50 μ L of a 50% slurry of streptavidin-sepharose beads (Amersham Biosciences) for 2 h at 4°C. Beads were pelleted by brief centrifugation. Beads were then washed three times with lysis buffer, and biotinylated proteins were eluted, SDS-PAGE-separated, and immunoblotted with anti-Lingo-1 antibody. Aliquots from lysates were collected and blotted against Lingo-1 and Tubulin to ensure equal amounts of protein in all samples.

Animals

A total of five OF1 pregnant mice (Iffa Credo, Lyon, France) were used in the present study. The mating day was considered as embryonic day 0 (E0) and the day after birth (in the night between E19 and E20) as postnatal day 0 (P0). Animals were killed at the following stages: E16, P0, P5, P10, P15, P21, and A (adult). Three to five animals from at least three different litters were processed for immunocytochemistry and immunoblotting at each of the stages analyzed. Fetuses were removed by caesarean section after deep anesthesia of the mother with chloral hydrate (3.5 mg/kg intraperitoneal injection). Postnatal mice were anesthe-

tized with 4% halothane. All animals were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde dissolved in phosphate buffer 0.12M (pH 7.2–7.4). After perfusion, dissected brains were removed from the skull and post-fixed in the same solution for 12 h, cryoprotected in 30% sucrose and sectioned on a freezing microtome (50- μ m thick for E16 and 30 μ m for P0-adult). For double immunohistochemical detection of Lingo-1 and Myt1L using the Lingo-1 polyclonal antibody raised in goat, mice were perfused and post-fixed as above and 30- μ m thick sections were obtained using a vibratome (Leica). All animal procedures were performed in accordance with the guidelines approved by the Spanish Ministry of Science and Technology and following the European Community Council Directive 86/609 EEC.

Immunohistochemistry

Free floating sections were permeabilized with PBS containing 0.5% Triton X-100 and blocked with 10% normal goat serum containing anti-mouse or anti-rabbit Fab fragments (1/50 dilution; Jackson Immunochemical) to avoid unwanted cross-reactivity with the immunoreagents, and incubated with primary antibody (Anti-Lem1 p1331) overnight at 4°C. Tissue-bound primary antibodies were detected using the avidin-biotin peroxidase complex (ABC) as indicated by the manufacturer (Vector Laboratories). Immunoreagents were diluted in PBS containing 0.5% Triton X-100, 0.2 gelatin, and 5% preimmune serum. After development with 0.05–0.07% diaminobenzidine and 0.01% H₂O₂, sections were mounted onto gelatinized slides, dehydrated, and coverslipped with EukittTM (Merck).

Immunocytochemical controls, including omission of the primary antibody or its substitution by normal serum, prevented immunostaining. Parallel, additional sections were stained with cresyl violet or alternatively processed by the double immunofluorescence detection of Lingo-1 and Calbindin or Parvalbumin or Myt1L by using Alexa-Fluor 488, Alexa-Fluor 568 tagged secondary antibodies (Molecular Probes). Sections were mounted on Fluoromount (Vector Laboratories) and analyzed with a confocal microscope (TCS SPII, Leica) or an Olympus FluoView SV 500 confocal microscope. All images were obtained in sequential laser scanning mode to avoid fluorochrome cross-excitation. Additional sections were double processed for the detection of Lingo-1 and MAG mRNA as indicated (Mingorance et al., 2005).

Immunoprecipitation

Seven days postnatal mouse brains were disrupted with a Potter homogenizer (10 strokes at 600 rpm) in Lysis Buffer A. For cell lines, transfected COS-7 cells were lysed on ice for 15 min with buffer A. In both cases, lysates were centrifuged for 20 min at 12,000g and supernatants were used for immunoprecipitation assays. Protein A/G (Santa Cruz) was incubated with 2 μ g of anti-FLAG, 4 μ g of anti p75, or 4 μ g of anti NgR1 antibodies for 2 h and after three washes with Lysis Buffer, brain homogenates (1 mg/sample) or cell line

extracts (0.5 mg/sample) were added to the assay overnight at 4°C with shaking. The immunocomplexes were washed three times with Lysis Buffer A and protein attached to the beads eluted with SDS-PAGE sample buffer.

RT-PCR

Quantitative real-time PCR was performed for Lingo-1 on cerebellum and anterior brain homogenates taken over a developmental time course. Mouse mRNA was extracted from E16, P0, P5, P10, P15, P21, and adult brains using Trizol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. Purified RNAs were cleaned up using RNeasy columns (Qiagen) and used to generate the corresponding cDNAs that served as PCR templates for Lingo-1 mRNA quantification. Data were normalized with respect to α -tubulin mRNA levels. Lingo-1 forward primer was, 5'-CCTGGTGCTGCTGTTTCT-3' and reverse primer was 5'-CCCCGTCCTCATATCATCTT-3'. α -tubulin forward primer was 5'-AAGGAGGATGCTGCCAATAA-3' and reverse primer was 5'-GCTGTGGAAAACCAAGAAGC-3'.

PCR amplification and detection were performed with the ROCHE LightCycler 480 detector, using 2X SYBR GREEN Master Mix as reagent following the manufacturer's instructions. The reaction profile was: denaturation-activation cycle (95° for 10 min) followed by 40 cycles of denaturation-annealing-extension (95°-10', 60°-40', 72°-1') and a final melting cycle (95°-5', 72°1', 98°-continuous). Each sample was amplified in triplicate. mRNA levels were calculated using the LightCycler 480 software.

Yeast Two-Hybrid Screen

A fragment corresponding to the C-terminal domain of Lingo-1 was amplified by PCR using primer R3 (5' CCTGGTGCTGCTGTTTC 3') and 403modSalI (5' CTCGTCGACTATCATCTTCATGTTGAAGCTTG 3') from IMAGE clone 172219 DNA. The resulting fragment was cloned into pGEM-T vector (Promega). Next, an *NcoI-SalI* fragment was excised and subcloned into pAS2-1. This clone was used as a bait in a yeast two-hybrid screen of a pACTII fetal brain cDNA library (MatchMaker yeast two-hybrid system; Clontech, Mountain View, CA). Y190 yeast strain was used for cotransformation and clones were selected by growth on Trp/Leu/His deficient medium and screened using a β -galactosidase assay. Positive clones were further verified by sequencing and retrotransformation with the bait vector followed by β -galactosidase assay.

Pull Down Assay

The intracellular domain of LINGO-1 was amplified using primer F1 (5' TGGGAAGGACTGGAGAG 3') and primer 403BamHI (5' GAGGGATCCTGCCTGGTGCTGCTGTT TCTCTG 3') on IMAGE clone 172219 DNA. The PCR fragment was then cloned into pGEM-T vector (Promega).

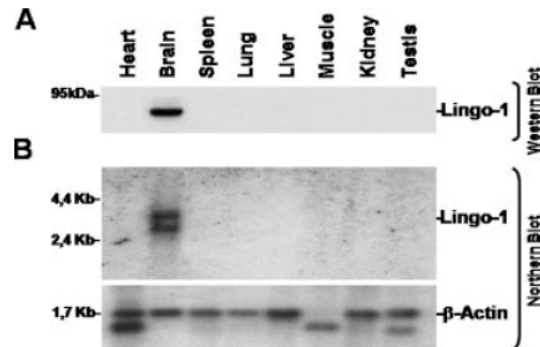


Figure 1 Specific expression pattern of Lingo-1. (A) Western blot and (B) Northern blot hybridization analysis of Lingo-1 expression in the indicated adult mouse tissues. For Western-blot assay samples were subjected to SDS-PAGE, transferred on to PVDF membranes, and developed with Lingo-1 antibody, detecting a single band exclusively on brain samples with an apparent molecular weight of 90 kDa. Lingo-1 probe used for Northern-blot experiments, containing the Lingo-1 mouse cDNA fragment, detected two alternative mRNAs bands exclusively on brain samples between 2.4 and 4.4 kb. Hybridization with the mouse β -actin probe was used as a control.

Digestion with *BamHI-EcoRI* yielded a fragment that was then subcloned into pGEX-2T GST expression vector (Amersham-Pharmacia). The Lingo-1 GST fusion protein and GST protein alone were produced in *E. coli* and bound to glutathione-sepharose 4B beads (Amersham-Pharmacia). HEK293 cell extracts were used as a source of endogenous Myt1l and incubated with Lingo-1 GST or GST alone beads, overnight, 4°C. After three washes in PBS, beads were resuspended in Laemmli buffer, denatured to release bound protein and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-Myt1l (Kim et al., 1997), anti-LINGO1, and anti-FLAG m2 (SIGMA) antibodies.

RESULTS

Pattern of Expression of Lingo-1 Protein *In Vivo*

Initial characterization of the Lingo-1 protein expression pattern has been sparsely described and a detailed description of the general pattern of distribution and cellular localization of Lingo-1 is missing (Mi et al., 2004; Mi et al., 2005; Okafuji and Tanaka, 2005; Lee et al., 2007). First, we used a commercially available anti-Lingo-1, antibody with good performance in Western blotting, to examine the distribution of mouse Lingo-1 protein in adult tissues (see Fig. 1). Our results indicate that Lingo-1 protein is enriched in the brain [Fig. 1(A)]. This coincides with the pattern observed by Northern blot [Fig. 1(B)], in agree-

ment with similar analyses performed at the mRNA level in human (Carim-Todd et al., 2003) or rat tissues (Mi et al., 2004).

Given the poor performance of the commercial anti-Lingo-1 antibody in immunohistochemistry, and to better ascertain the pattern of Lingo-1 distribution

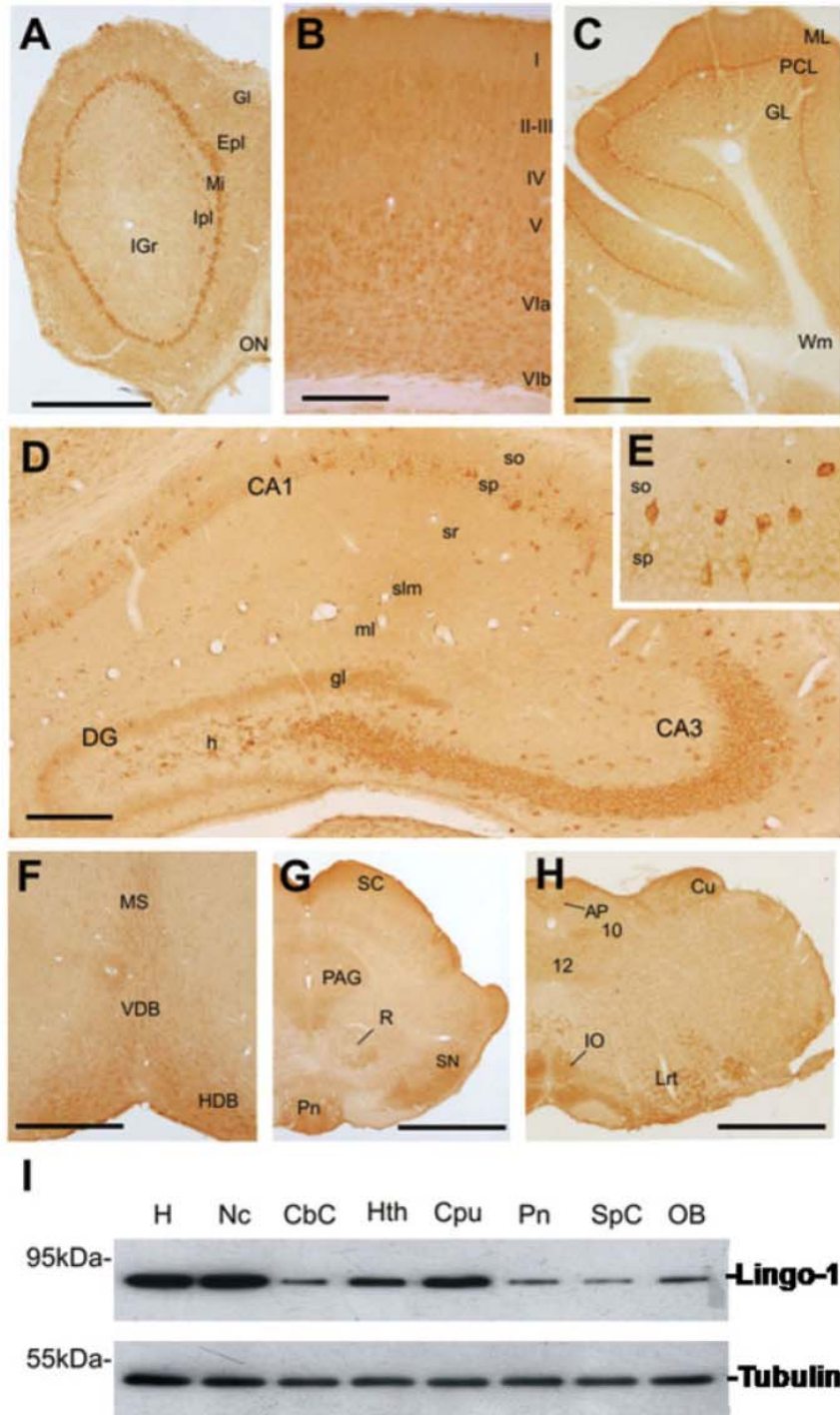


Figure 2

in brain regions at the cellular level, we generated an affinity purified polyclonal antibody (anti-Lern1-p1331) against a peptide sequence in the extracellular region next to transmembrane domain. The specificity of the antibody was determined in transfected cells with Lingo-1 expressing vectors (Suppl. Fig 1). More recently a Lingo-1 polyclonal antibody raised in goat was also validated in our hands for immunohistochemistry. This antibody renders good and specific Lingo-1 immunodetection, especially in vibratome sections (see above) and was used in double immunostaining with rabbit raised primary antibodies (e.g., Myt1L).

Immunohistochemical analysis of adult brain sections revealed that Lingo-1 protein is present prominently in neocortex, hippocampus, thalamus, amygdala, with lower levels in cerebellum and basal nuclei (Fig. 2, Table 1). Particular subsets of cells in different brain regions were labeled specifically with our antibody: mitral cells in the olfactory bulb [Fig. 2(A)], pyramidal neurons in the cerebral cortex [Fig. 2(B)], Purkinje cells in the cerebellum [Fig. 2(C)], hippocampal neurons [Fig. 2(D,E)], and in neurons of the medial septum [Fig. 2(F)], the superior colliculli, the substantia nigra and the red nucleus [Fig. 2(G,H)]. In the hippocampus, closer inspection showed expression in the granule cells of the dentate gyrus, in the hilar cells, and in the pyramidal cells of the CA1-4 layers, with higher expression in CA3 than in CA1 [Fig. 2(D)]. In addition, while no differences were observed among neuronal subtypes in the neocortex, hippocampal interneurons displayed increased immunoreactivity levels when compared with princi-

pal neurons (see Fig. 3). We detected high expression levels of Lingo-1 in most but not all the hippocampal interneurons in the adult brain [Fig. 2(D)]. However, the different subsets of interneurons analyzed, (e.g., calbindin- and parvalbumin-positive) in the hippocampus *in vivo* also display Lingo-1, ubiquitously distributed in the whole cell and processes.

These data were contrasted with quantitative biochemical analysis of different dissected brain regions. Western blotting showed Lingo-1 protein levels are highest in hippocampus, neocortex, and striatum, while lower in cerebellum, pons, bulb, and spinal cord [Fig. 2(I)], confirming with commercial anti-Lingo-1 antibodies our histological results obtained with anti-Lern1-p1331 [Fig. 2(A-H)].

Subcellular Targeting of Endogenous Lingo-1 Protein to Membrane Compartments

Previous observations indicated that Lingo-1 labels neuronal processes, which might indicate that it is targeted to the plasma membrane *in vivo*. Transfected cells may show modified intracellular processing of proteins in terms of post-translational glycosylation and proteolysis. Thus, we decided to study the subcellular distribution of endogenous Lingo-1 in cultured untransfected cerebellar granular neurons (CGNs). We performed protein sub-fractionation experiments using a differential filtration and centrifugation technique followed by Western blot (Suppl. Fig. 2). Our results indicate that Lingo-1 protein was exclusively

Figure 2 Expression of Lingo-1 in adult mouse brain. (A-H) Analysis of Lingo-1 expression in adult mouse brain by immunohistochemistry using anti-Lern1 p1331 antibody. Lingo-1 labeling was intense in (A) the mitral cell layer of the olfactory bulb, (B) pyramidal cells of the neocortex and (C) Purkinje cells of the cerebellum. (D,E) Photomicrographs illustrating details of Lingo-1 immunoreactivity in the hippocampus. Note the intense labeling of interneurons located in the pyramidal layer and the stratum oriens (boxed area in E). (F-H) Low power photomicrographs of the (F) thalamus, (G) superior colliculli, and (H) brain stem. (I) Analysis of Lingo-1 expression in adult mouse brain by Western-blot using anti-Lingo-1 antibody. Tubulin antibody was used to ensure equal amounts of protein in each sample. Abbreviations: 10, dorsal motor nucleus vagus nerve; 12, hypoglossal nucleus; AP, area postrema; CA1-3, cornus ammonis region 1-3; CbC, cerebellar cortex; Cpu, caudate putamen; Cu, cuneatu nucleus; DG, dentate gyrus; Epl, external plexiform layer of olfactory bulb; GL, granule cell layer; gl, dentate gyrus granule cell layer; Gl, glomerular layer of olfactory bulb; h, hilus; H, Hippocampus; HDB, nucleus horizontal diagonal band; Hth, Hypothalamus; IO, inferior olive nuclei; Igl, internal plexiform layer of olfactory bulb; IGr, internal granular layer of olfactory bulb; I-VIb, cortical cell layers; LRt, lateral reticular nucleus; Mi, mitral cell layer of olfactory bulb; ML, molecular layer; MS, medial septum; Nc, neocortex; OB, olfactory bulb; ON, olfactory nerve layer; PCL, Purkinje cell layer; PAG, periaqueductal gray; Pn, pontine nuclei; R, red nucleus; SC, superior colliculus; slm, stratum lacunosum-moleculare; SN, substantia nigra; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; SpC, spinal cord; sr, stratum radiatum; VDB, nucleus vertical limb diagonal band; Wm, white matter. Scale bars: A, 500 μm pertains to B. C, 500 μm . D-J, 50 μm .

Table 1 Lingo-1 Protein Distribution During Mouse Brain Development

	E16	P0	P5	P10	P15	P21	Adult
<i>Telencephalon</i>							
Olfactory bulb							
Glomerular cell layer	—			—	—	—	—
Mitral cell layer	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Granular cell layer	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+
Neocortex							
Marginal zone	—						
Cortical plate	+	+					
Subplate/intermediate zone	+	+					
Ventricular zone	+		+				
Subventricular zone/RMS	+/-	+/-	+/-	+/-			
II–III layers			+	+	+	+	+
IV–VI layers			++	++	++	++	++
Tenia tecta	+/-	+/-	+	++	++	++	++
Cingulate/retrosplenial	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Piriform cortex	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Entorhinal cortex	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Hippocampus							
Subiculum	+	+	+	++	++	++	++
Alveus	—	—	—	—	—	—	—
CA1, CA2	+	+	++	++	++	++	++
CA3	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Dentate gyrus	+	+	+	+	+	+	+
Hilus			+	++	++	++	++
Interneurons			++	+++	+++	+++	+++
Fimbria/fornix	—	—	—	—	—	—	—
Basal forebrain							
Ganglionic eminence	—						
Caudate/putamen	+/-	+/-	+	+	+	+	+
Globus pallidus	+/-	+/-	++	++	++	++	++
Medial septum/diagonal band	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Dorso-lateral septum	+/-	+/-	+	+	+	+	+
Amygdaloid complex	+	++	++	++	++	++	++
<i>Diencephalon</i>							
Epithalamus/habenula/Scn	+	+	++	++	++	++	++
Thalamus							
Dorso-lateral nuclei	+	+	+	++	+	+	+
Medial nuclei	+	+	+	++	++	+	+
Ventral nuclei	+	+	++	++	++	++	++
Geniculate nuclei	+	+	++	++	++	++	++
Reticular nuclei	+/-	+	+	++	++	++	++
Hypothalamus							
Dorso-lateral nuclei	+/-	+/-	+	++	++	++	++
Medial nuclei	+/-	+/-	+	++	++	++	++
Ventral nuclei	+/-	+/-	+	++	++	++	++
Arcuate nucleus	+/-	+/-	+	++	++	++	++
Mammillary nucleus	+/-	+/-	+	++	++	++	++
Periventricular nuclei	+/-	+/-	+	++	++	++	++
Paraventricular nuclei	+/-	+/-	+	++	++	++	++
<i>Mesencephalon</i>							
Periaqueductal grey area	+/-	+/-	+	+	+	+	+
Raphe nuclei	+	+	++	++	++	++	++
Superior colliculus	+/-	+	+	+	+	+	+
Inferior colliculus	+/-	+	+	+	+	+	+

Table 1 (Continued)

	E16	P0	P5	P10	P15	P21	Adult
Substantia nigra	+/-	+	++	+++	++	++	+++
Red nucleus	+/-	+	+	+++	++	++	+++
Oculomotor nucleus	+	+	++	++	++	++	++
Me5	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Hindbrain</i>							
<i>Cerebellum</i>							
Cerebellar primordium	+/-	+/-					
Deep nuclei		+/-	++	++	++	++	++
External germinal layer							
Purkinje cell layer			+++	+++	+++	+++	+++
Internal granular layer			+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>Brainstem</i>							
Pontine nuclei, reticular	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Reticular formation	+/-	+	+++	+++	+++	+++	+++
Superior olive	+	+	++	++	++	++	++
Inferior olive	+/-	+/-	++	++	++	++	+++
Cochlear nucleus	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Trigeminal nucleus	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Facial	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Spinal nuclei	+/-	+/-	+++	+++	+++	+++	+++
Hypoglossal			++	++	++	++	++
Cuneate nucleus			+++	+++	+++	+++	+++

Very low (+/-), low (+), moderate (++), high (+++), and very high (++++) levels of Lingo-1 expression are shown in each developmental stage. Non detectable expression is also indicated (-). An empty cell means that the corresponding areas were not defined at that developmental stage.

localized in the membrane compartment as determined by the commercial anti-LINGO1 polyclonal antibody [Fig. 4(A)]. However, this technique does not allow discriminating between different membrane compartments. To better determine whether endogenous Lingo-1 protein is localized to the plasma membrane, we performed biotinylation experiments in cultured CGNs [Fig. 4(B)]. Thus, after biotinylation of plasma membrane proteins in nonpermeabilized CGNs, we were able to find that Lingo-1 was biotinylated. Taken together and as predicted from its molecular structure, Lingo-1 is targeted to the plasma membrane of neurons *in vivo*, although we cannot completely rule out that a percentage of the protein is present in other intracellular compartments.

Developmental Expression of Lingo-1 Protein

Next we aimed to explore the developmental expression of Lingo-1 by using Western Blot and immunohistochemical techniques. Western blot analysis revealed a progressive increase in Lingo-1 protein levels from late embryogenesis through postnatal stages (see Fig. 5). In addition, there were significant differences in Lingo-1 protein expression between the anterior and posterior telencephalic regions [Fig. 5(A)]. In

our study, we determined that Lingo-1 expression peaks around P21 in anterior brain whereas it peaks at P5 in the cerebellum [Fig. 5(B)], suggesting putative functional differences. This is somewhat in contrast with the mRNA profile as determined by RT-PCR [Fig. 5(C)], pointing to the fact that mRNA levels mainly profile somatic expression and that protein may reflect levels accumulated at neuronal terminals. This highlights the relevance of describing expression at the protein level with cellular resolution. Lingo-1 protein levels were very low in all neuronal and non-neuronal cell lines tested in comparison with brain tissue protein extracts (Suppl. Fig. 3). There were minor size differences, which appeared species specific likely to be due to post-translational modifications given the almost identical amino acid sequences.

From immunohistochemical analysis with the anti-Lern1-p1331 antibody we can conclude that Lingo-1 protein is extensively expressed across the CNS through late embryogenesis and during postnatal development, showing a peak of expression around the first week after birth (Table 1). Importantly, it is not detectable in myelinating oligodendrocytes (MAG-positive) at P15 (Suppl. Fig. 4) providing further evidence of a largely neuronal specific distribution already at late postnatal stages that would continue on through adult stages.

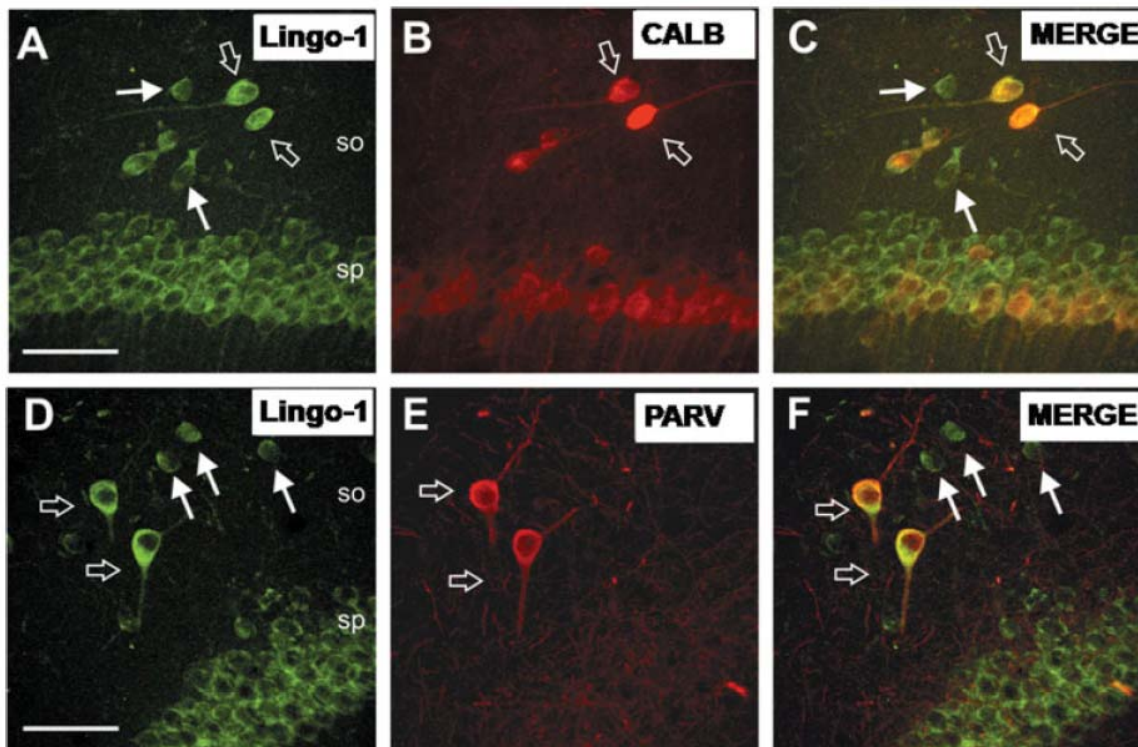


Figure 3 Immunohistological analysis of Lingo-1 expression in interneurons from the hippocampus (A–C) High magnification photographs illustrating double-labeled (Calb/Lingo-1) interneurons (open arrows) in the stratum oriens. (D,E) High magnification photographs illustrating double-labeled (Parv/Lingo-1) interneurons (open arrows) in the stratum oriens. Note that some Lingo-1-positive cells are not labeled with Calbindin or Parvalbumin antibodies (arrows in B,E). Abbreviations are as in Figure 2. Scale bar: A–F, 25 μ m.

Colocalization of Lingo-1 with Nogo Receptor Complex Components NgR1/p75

Lingo-1 has been established as an essential component of the receptor complex that responds to the myelin components NogoA, Omgp or MAG, resulting in inhibition of axonal regeneration (Mi et al., 2004). Lingo-1 has been shown to be necessary for Nogo receptor activity, since dominant negative forms interfere with the ligand induced responses *in vitro* (Mi et al., 2004).

One basic prerequisite for Lingo-1 involvement in receptor complex activity *in vivo* would be that all the components are present in the same cells so that they are able to interact. Western blot analysis of cortical brain extracts showed a clear overlap in time between the three components, although we have found that Lingo-1, p75, and NgR1 proteins have different protein expression temporal profiles [Fig. 5(B,D,E)]. We observed strong expression during embryonic and early postnatal stages of Lingo-1 and

p75 in absence of NgR1, while in the adult p75 levels were reduced and NgR1 levels remained constant. Whereas Lingo-1 and NgR1 show overlapping tissue distributions and similarly strong anterior-posterior regional differences, p75 shows no differences between the cerebellum and the rest of the brain. NgR1 shows little differences in kinetics but strong anterior-posterior differences in total protein levels. Overall, we observed differences between anterior brain and cerebellum in the localization and levels of the three coreceptors, suggesting that a Lingo-1/NgR1/p75 receptor complex may not be uniformly present to respond to the endogenous ligands in the intact brain.

To establish biochemically whether endogenous Lingo-1 colocalizes in the same membrane compartment *in vivo* together with other tripartite Nogo receptor complex components, we performed sucrose gradient fractionation experiments. Our results support the targeting of the endogenous Lingo-1 protein to specific membrane fractions, as shown before for

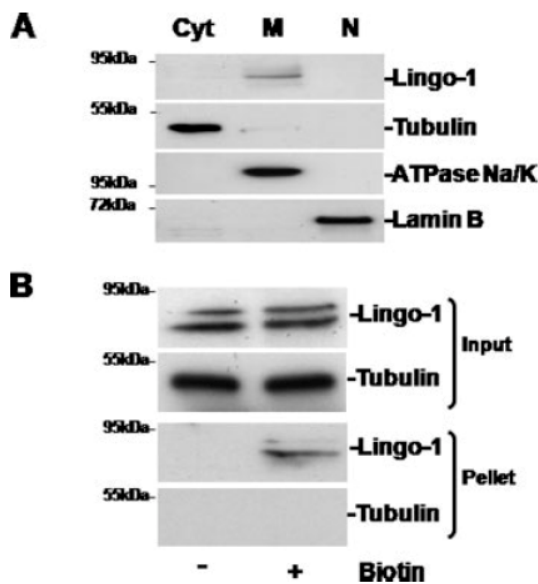


Figure 4 Subcellular localization of Lingo-1. (A) Localization of Lingo-1 on CGNs. The separation of nuclear, cytosolic and membrane fractions from 7-day CGN cultures was carried out using the Qproteome cell compartment kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Samples were subjected to SDS-PAGE, transferred on to PVDF membranes, and developed against Lingo-1 and the following subcellular markers: tubulin (cytosolic), ATPase Na/K (membrane), and lamin B (nuclear). (B) Localization of Lingo-1 in plasma membrane from CGN cultures. Cell cultures were biotinylated as described in materials and methods and plasma membrane proteins were pulled down using streptavidin-sepharose beads. Complexes bound to streptavidin were washed, subjected to SDS-PAGE, transferred on to PVDF membranes, and developed with anti-Lingo-1 antibody (Pellet). Top panels show equal amounts of Lingo-1 and Tubulin present in the samples before pull-down (input).

the recombinant protein [Fig. 6(A)]. In addition, when analyzing P7 brains, we found that Lingo-1, NgR1, and p75 copurified in subcellular fractions enriched in plasma and ER membranes. Besides these common compartments, each component was enriched in fractions that differed in their density properties, therefore suggesting each gene product also associates to different membrane compartments.

Lingo-1 Interacts *In Vivo* with p75 and NgR1 Independently of its Intracellular Domain

Although several authors have proposed a role for Lingo-1 as a member of the myelin inhibitor receptor complex, to date there has been no direct proof of the

existence of the formation of this complex *in vivo*. All evidence so far has relied on over-expression of the components in cell lines (Mi et al., 2004; Mi et al., 2005; Park et al., 2005; Shao et al., 2005). In such assays it was shown that only the presence of three receptors (NgR1, p75, and Lingo-1; or NgR1; TAJ/TROY and Lingo-1) was able to mediate receptor response to NogoA or MAG in RhoA activation assays.

Indirect functional evidence of the existence of such a complex comes from the use of dominant negative or inactivating forms of Lingo-1 such as the extracellular moiety (LINGO-Fc) or a form lacking the C-terminal intracellular domain. These were used to show that Lingo-1 must be present and is required endogenously by DRG or CG neurons to be able to respond to myelin inhibitory activity on neurite extension (Mi et al., 2004). This same type of experiment was used to demonstrate the role of NgR1 (Fournier et al., 2001), p75 (Wang et al., 2002; Wong et al., 2002) and TAJ/TROY (Park et al., 2005; Shao et al., 2005).

To demonstrate the existence of the tripartite complex *in vivo* we used coimmunoprecipitation assays. We used P7 brain extracts since at this time mice coexpress all three proteins [Figs. 4(A) and 6(A)]. Both NgR1 and p75 antibodies were able to bring down Lingo-1 protein in P7 whole brain extracts [Fig. 6(B)]. Together with the colocalization experiments described above, these results indicate that the three coreceptor molecules are able to interact *in vivo*.

The intracellular domain of Lingo-1 has been shown to be critical for Lingo-1 activity. Its deletion turns the protein into a dominant negative form, affecting ligand binding, neurite extension inhibition by the ligands *in vitro* and *in vivo* in response to injury, RhoA activation in neurons and oligodendrocytes, oligodendrocyte precursor differentiation into myelinating oligodendrocytes, and myelination of neurons in coculture (Mi et al., 2004; Mi et al., 2005; Ji et al., 2006; Mosyak et al., 2006; Lee et al., 2007). Thus, we next tested whether removal of this domain was able to affect the ability of Lingo-1 to interact with its partners in the receptor complex [Fig. 6(C)]. Our results indicate that the extracellular domain of Lingo-1 is sufficient to mediate the interaction.

Lingo-1 Intracellular Domain Interacts with the Myt1l Transcription Factor

To gain an understanding why the C-terminal domain of Lingo-1 is critical for its function, we screened for

interacting partners using the yeast two hybrid system with the intracellular domain alone as bait on a fetal cDNA library. Our main validated result was the iso-

lation of a partial clone of Myt11 (also known as png-1 or NZF-1) (Kim et al., 1997; Weiner and Chun, 1997). The interaction was confirmed by retro-trans-

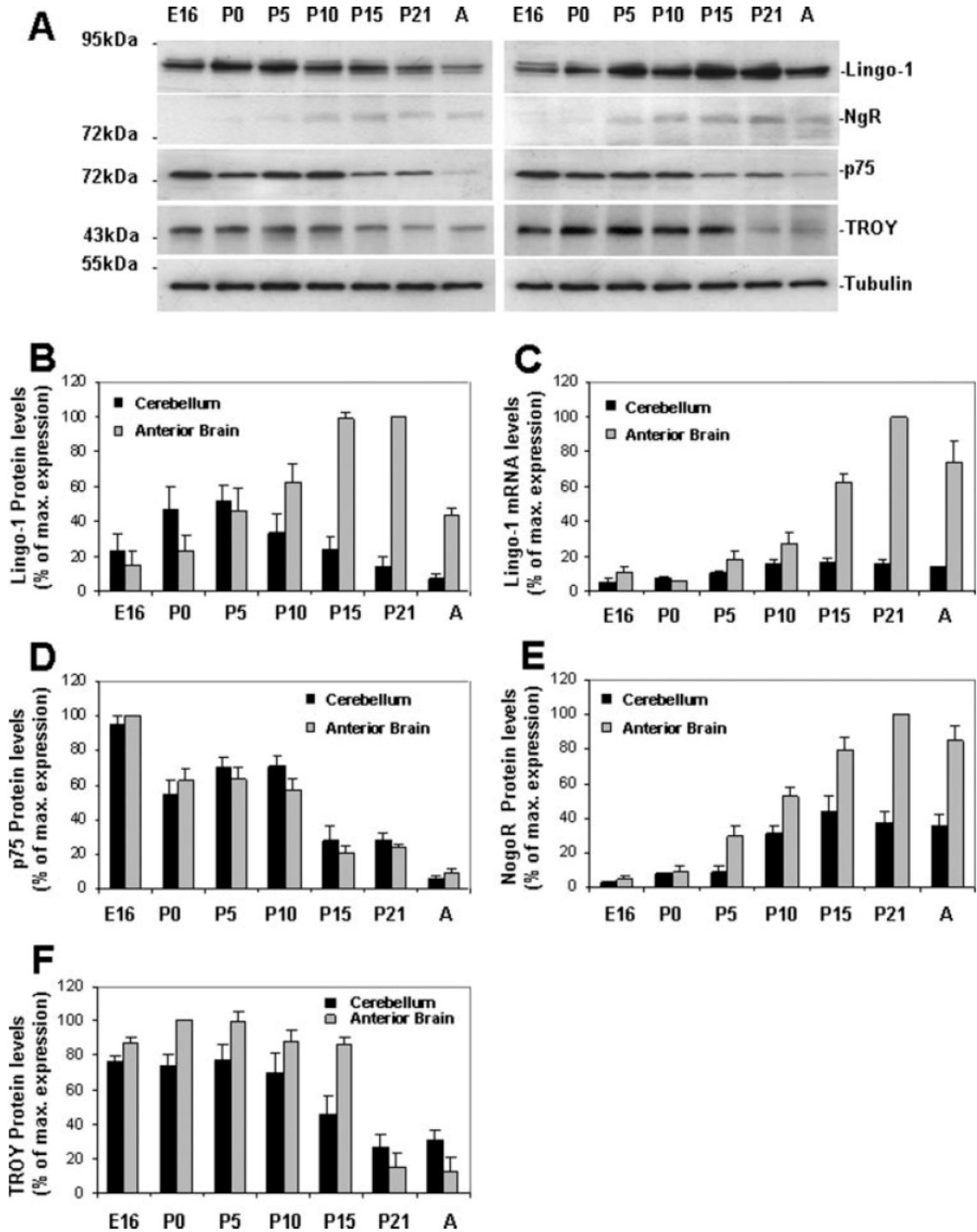


Figure 5

forming yeast (data not shown), by pull down of tagged protein expressed in *E. coli* [Fig. 7(A)] and by immunoprecipitation of Myt1l from COS cells over-expressing Lingo-1-FLAG [Fig. 7(B)]. Cell fractionation experiments showed that even though a major fraction of Myt1l is found in the nucleus, some Myt1l purifies with Lingo-1 in the membrane compartment [Fig. 7(C)]. These results indicate that the interaction can occur *in vivo*. To further determine this point, we first checked the pattern of expression of Myt1l by immunohistochemistry. Myt1l expression in the hippocampus in adult mice closely follows the labeling described with Lingo 1 [Fig. 8(A–F)]. The neuronal soma and dendrites of labeled cells were clearly observed over a pale background. Most importantly, double immunohistochemical detection demonstrated that most Lingo-1 positive neurons are also labeled with the Myt1l antibody in the hippocampus.

DISCUSSION

Neuronal NgR1 binds the myelin inhibitors NogoA, Omgp, and MAG and has been proposed to function as the ligand-binding component of a receptor complex that also includes Lingo-1 and p75, or Lingo-1, and TAJ/TROY to prevent axon regeneration and plasticity. However, recent studies have complicated this scenario concerning additional functions of ligands and/or coreceptors. For example, Venkatesh and coworkers have recently demonstrated in several studies that other myelin receptors, besides the tripartite Nogo receptor, can take a role in preventing axon extension in a cell specific way (Venkatesh et al., 2005, 2007), and the same authors indicate that the participation of NgR1 in preventing axon regeneration is only relevant in the first stages after lesion and that myelin derived inhibition is NgR1-independent at chronic stages (Chivatakarn et al., 2007). On the other hand, emerging evidence demonstrates a myriad of functions for Nogo receptor ligands (i.e., during

development) different from those reported in preventing axon regeneration in adult lesions. The same happens with compounds of the Nogo receptor complex, since p75 was initially described as the low affinity receptor for NGF (Chao, 1994) or TROY (TAJ) that was identified as an orphan member of the TNF receptor super-family able to mediate caspase-independent cell death (Eby et al., 2000). Taken together, it is reasonable to consider that roles of Lingo-1 are still not fully determined, and that as a first step to ascertain these functions a detailed study of its pattern of expression and cellular distribution is needed. This was the main objective of the present study.

Lingo-1 Protein is Present in Neurons and in Immature Oligodendrocytes During Development and in the Adult Brain

Our findings demonstrate that Lingo-1 protein is expressed in the mouse telencephalon throughout brain development (from early to adult stages). More interestingly, the differences in both rostro-caudal protein distribution and temporal evolution of Lingo-1 protein levels, together with the fact that the Lingo-1 protein is observed in most but not in all neurons, already suggest that Lingo-1 may perform different functions that are under cellular and developmental control, first acting as a putative signaling molecule (see below) and further participating in Nogo receptor complex functions during critical developmental periods or after adult lesions.

Functions of members of the Nogo receptor complex can affect particular intracellular responses not only in a cell-specific but also in a time-dependent manner. For example, as indicated above, NgR1 functions in preventing axonal regeneration, are required only for the acute growth cone-collapse acting on the neuronal cytoskeleton (mainly via Rho Kinase) but not for the chronic growth-inhibitory actions of myelin inhibitors (Chivatakarn et al., 2007). In this respect, Ji et al. demonstrated that LINGO-Fc treat-

Figure 5 Lingo-1 expression during mouse brain development. (A) Western-blot analysis of expression levels of Lingo-1 and its coreceptors NgR1, p75, and TROY during mouse brain development. Brain cell extracts from cerebellum and anterior brain from the indicated developmental stages were subjected to SDS-PAGE, transferred on to PVDF membranes and developed with antibodies against Lingo-1, NgR1, p75, and TROY. Anti-tubulin antibody was used to ensure equal amount of protein in the assay. (B,D,E,F) Densitometries of the Western blots from three independent sets of animals. Levels were expressed taking the maximum value as 100%. (C) RT-PCR analysis of Lingo-1 levels during mouse brain development. Cerebellum and anterior brain mRNAs from the indicated developmental stages were subjected quantitative Real-time PCR (see material and methods for details). Levels were expressed taking the maximum value as 100%, expressing the values from three independent sets of animals.

ment, blocking Lingo-1/NgR1 interaction, promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury, but also prevents neurons and oligodendrocytes from cell death in the acute phase after lesion (Ji et al., 2006). Their last data suggest additional functions for Lingo-1 besides those exclusively related to axon regeneration. Our results demonstrate that Lingo-1 is expressed at embryonic stages in sev-

eral brain regions in cells lacking NgR1. Although this hypothesis awaits for further studies, our data points to the possibility that Lingo-1 may participate in neuronal development and maturation. However, given the extensive presence of Lingo-1 from early embryonic stages on, it is intriguing that the loss of function *in vivo* by targeted deletion fewer effects on normal neuronal development (Mi et al., 2005). On

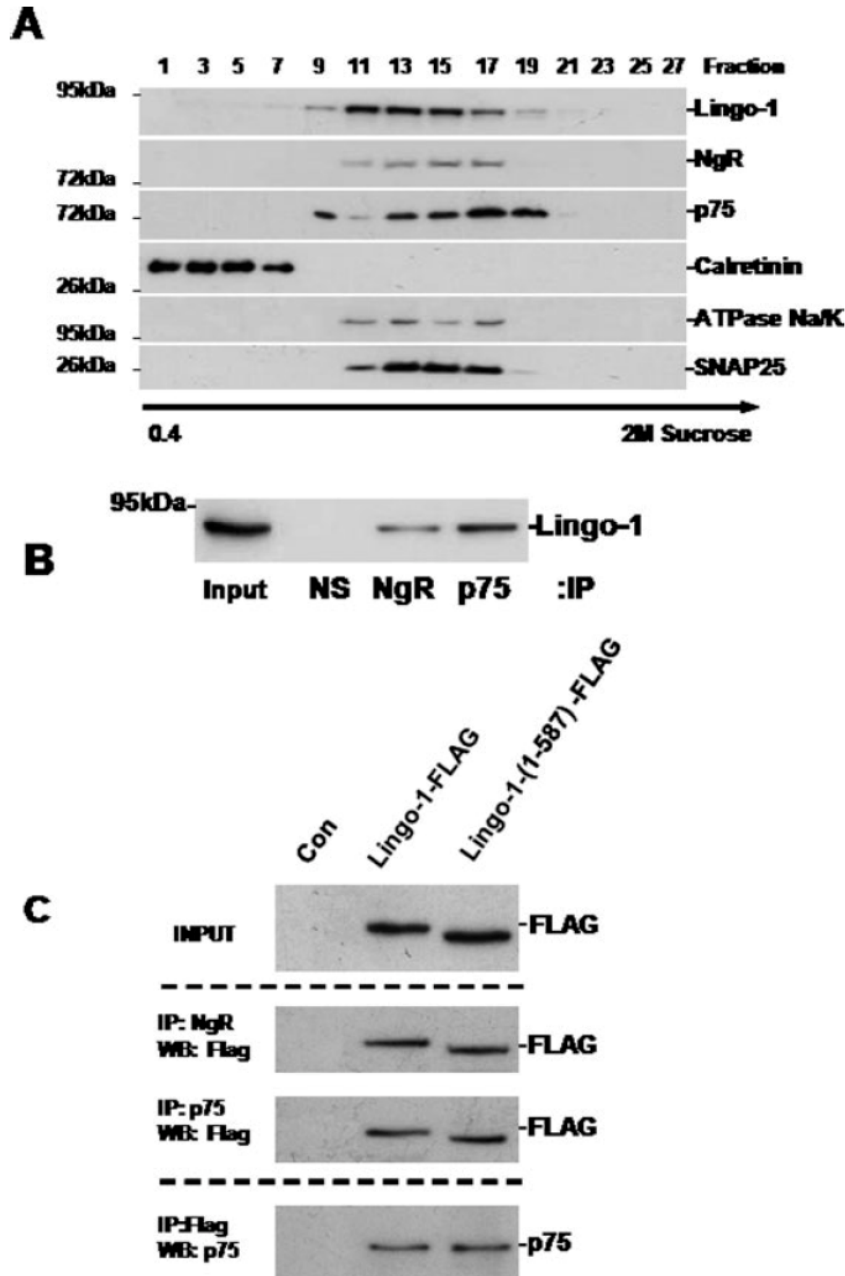


Figure 6

the other hand, mice lacking NgR1 or ligands of Nogo receptor complex are also viable (i.e., Filbin, 1996; Kim et al., 2003; Simonen et al., 2003; Zheng et al., 2003; Lee et al., 2004; Zheng et al., 2005). This could either indicate a redundant role that can be compensated upon Lingo-1 or NgR1 loss by other gene products or its implication in cell processes not analyzed to date. For example, the participation of Nogo-A or Omgp in functions different from those associated to axonal regeneration has been recently revealed (Nie et al., 2006; Voeltz et al., 2006; Mingorance-Le Meur et al., 2007). As indicated, further studies will be required to ascertain these possibilities.

We were unable to determine a clear correlation between Lingo-1 expression and a particular neuronal phenotype. However, some conclusions can be made from our data. First, neural expression of Lingo-1 protein is not exclusively associated with myelinated neurons since neurons lacking myelin sheaths displayed high levels of Lingo-1 (e.g., those lying in the septum or the hippocampus). Some of these neurons also lack NgR1 in the adult (e.g., cholinergic cells in the septal area) (Hunt et al., 2002a,b; Mingorance et al., 2004). The septum and the hippocampus are two of the most well studied brain regions in terms of axonal plasticity and maturation. Among the myriad aspects playing a role in both of these processes, the participation of growth factors in cell survival and neuronal maturation is one of the most analyzed historically. Increasing evidence indicates that growth factors involved in neuronal survival and axon specification, and in connectivity of a particular neuronal population during development, also play roles during its myelination. In this respect, NGF has been shown to induce Lingo-1 expression in DRG cultures inhibiting axonal myelination (Lee et al., 2007).

Thus, it is tempting to suggest that Lingo-1 expression in cholinergic cells of the medial septum can be regulated by NGF to inhibit myelination of cholinergic fibers during their maturation. Indeed, it seems that Lingo-1 and NgR1 have opposite regulation under certain experimental conditions in the adult. For example, treatment with BDNF or kainic acid increases Lingo-1 and decreases NgR1 expression in hippocampal neurons (Josephson et al., 2003; Mingorance et al., 2004; Trifunovski et al., 2004; Gil et al., unpublished results). Whether NgR1 and Lingo-1 have opposing or compensatory activities during neuronal development remains to be seen.

On the other hand, it is well known that BDNF influences the phenotype of GABAergic interneurons (i.e., Rutherford et al., 1997) and this promotes the maturation of cortical inhibition during early post-natal life, thereby regulating the critical period for visual cortical plasticity (Huang et al., 1999). We have determined expression of Lingo-1 by hippocampal interneurons that receive relevant innervation (cholinergic and GABAergic) from septal regions, which modulate hippocampal activity. In this respect, NgR1-deficient mice displayed abnormal consolidation of the neural circuitry established during experience-dependent plasticity in contrast to what is reported for BDNF loss of function (McGee et al., 2005), and BDNF down-regulates NgR1 as indicated above. On the other hand, p75 expression remains nearly constant throughout development in the neocortex (Rossi et al., 2002). Taken together, the putative participation of Lingo-1 in GABAergic maturation during cortical development merits further study.

The main conclusion from the Lingo-1 loss of function model as described so far is that Lingo-1 must have an inhibitory activity on oligodendrocyte differentiation and myelination (Mi et al., 2005).

Figure 6 Lingo-1 associates with NgR1 and p75 *in vivo* and *in vitro*. (A) Localization of Lingo-1 on P7 mouse brain subfractionations. Supernatants of a first low rate centrifuged P7 mouse cell extracts were subfractionated onto a 0.4–2M sucrose gradient. Samples were subjected to SDS-PAGE, transferred on to PVDF membranes, and developed with the indicated antibodies: Lingo-1; the Lingo-1 coreceptors NgR1 and p75; the soluble protein calretinin; and the plasma membrane protein markers SNAP-25 and ATPase Na/K. Lingo-1 showed a single peak between fractions 9 and 19. Fractions from 11 to 17 were pooled for further experiments. (B) P7 mouse brain samples were subjected to immunoprecipitation with non specific serum (NS), anti-NgR1 or anti-p75. Immunoprecipitates and an aliquot of the whole cell extract (Input) were subjected to SDS-PAGE, transferred on to PVDF membranes, and developed with anti-Lingo-1 commercial antibody recognizing Lingo-1. (C) COS-7 cells were transfected with p75, NgR1, and either empty plasmid, Lingo-1-FLAG or Lingo-1-FLAG (1–587) plasmids as indicated. Cell extracts were subjected to immunoprecipitation with anti-FLAG, anti-NgR1, or anti-p75 and immunoprecipitated protein complexes were subjected to SDS-PAGE, transferred on to PVDF membranes, and developed with anti-FLAG or anti-p75. Top panel indicates Lingo-1 input used for the immunoprecipitation assay.

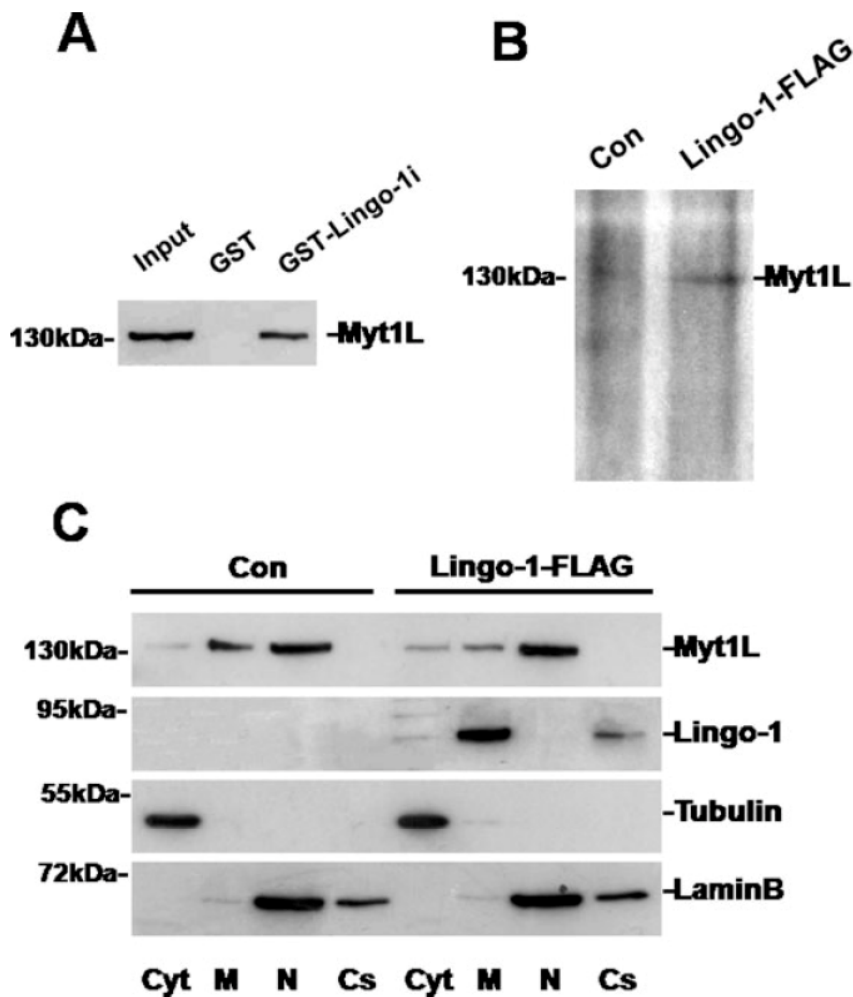


Figure 7 Lingo-1 interacts with the Myt1l transcription factor. (A) GST and GST-Lingo-1i expressing the intracellular domain of Lingo-1 were incubated with 500 μ g of COS-7 cell extract expressing endogenous Myt1l. Complexes were pulled down with glutathione, analyzed by SDS-PAGE and analyzed by Western-blot using the anti-Myt1l antibody. (B) COS-7 cells were transfected with Lingo-1-FLAG or empty vector (Con) and cell lysates were subjected to immunoprecipitation using the anti-FLAG antibody. Immunoprecipitates were processed by SDS-PAGE and Western-blotting analyzed with the anti-Myt1l antibody. (C) COS-7 subcellular fractions (Cyt, cytosol; M, membrane; N, nuclei; Cs, cytoskeleton) were obtained using the Qproteome cell compartment kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Samples were subjected to SDS-PAGE and Western-blot using anti-Myt1l, Lingo-1, Tubulin (cytosolic marker) and Lamin B (nuclear marker).

Indeed, it was recently shown that NGF inhibits myelination by increasing Lingo-1 levels (Lee et al., 2007). In this respect, our immunohistochemical results point to a lack of Lingo-1 expression in MAG-positive oligodendrocytes in the adult brain. These data are consistent with more recent results at the RNA level (Barrette et al., 2007). Interestingly, TROY and Lingo-1 have been reported to be

expressed in reactive astrocytes and microglia but not in oligodendrocytes in multiple sclerosis (MS) lesions and total levels of Lingo-1 were decreased in MS patients (Satoh et al., 2007). In contrast, Lingo-1 deficient mice showed increased myelin (Mi et al., 2004). Although these conflicting data could be associated to sample or species-related differences, Lingo-1 is expressed earlier at P7 (in rat) in pre-myelinating

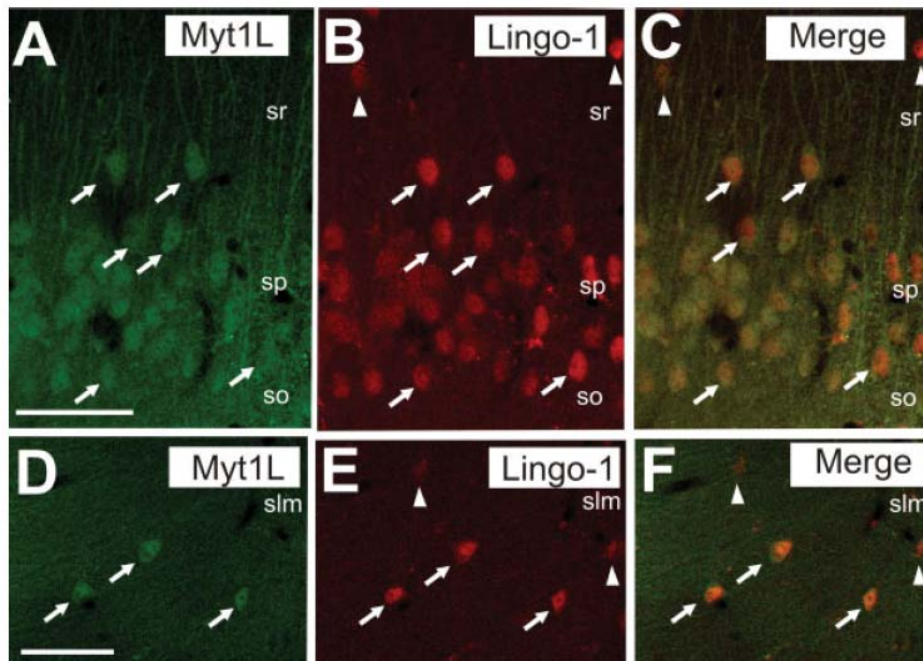


Figure 8 Double confocal colocalization of Lingo-1 and Myt1l in adult mouse hippocampus. (A–C) Double labeled sections against Myt1l (A) and Lingo-1 (B) using rabbit and commercial goat antibodies, respectively (see materials and methods for details). Most pyramidal neurons (arrows) are double labeled in the sp. Note that few Lingo-1 positive cells are Myt1l negative in the sr (arrowheads in B and C). (D–F) High power photomicrographs illustrating examples of double labeled interneurons (arrows) in the slm of CA1 region. For the confocal study, vibratome sections, necessary to allow specific Myt1l and Lingo-1 immunolabeling, were mounted on Fluoromount and analyzed on an Olympus FluoView SV 500 confocal microscope. All images were obtained in sequential scanning laser mode to avoid fluorochrome cross-excitation. Arrowheads in E–F point to Lingo-1 positive/Myt1l negative cells. Scale bars: A, 50 μ m; D, 50 μ m; B and C, E and F. Abbreviations as in Figure 2.

oligodendrocytes (Mi et al., 2005) but not by mature oligodendrocytes (present results, in mice). This indicates that Lingo-1 gene may be present in pre-myelinating oligodendrocytes and further down-regulated in mature oligodendrocytes. Such a pattern would be compatible with the role derived from the loss of function phenotype and from overexpressing wild type and dominant negative forms of Lingo-1 in oligodendrocytes (Mi et al., 2005). Therefore, how Lingo-1 participates modulating the maturation of myelinating oligodendrocytes and which factors act on Lingo-1 expression during development are open questions.

Lingo-1 Forms Complexes with NgR1 and p75 *In Vivo* During Brain Development

Here we describe the time window of parallel expression of Lingo-1, NgR1, and p75 proteins in postnatal stages and, for the first time, that they are able to

interact *in vivo*. Our study supports the existence of complexes *in vivo* in the intact CNS, and reinforces the essential nature of Lingo-1 for Nogo receptor complex function from the second postnatal week on. Besides this, the fact that we observe fractions that contain Lingo-1 in the absence of other coreceptors would suggest that it may have other roles on its own, possibly interacting with different molecular partners.

At the protein level, it has been shown that NgR1 and p75 proteins are expressed in regions that overlap with Lingo-1 expression (Hunt et al., 2002a,b; Josephson et al., 2002; Mingorance et al., 2005). Our results show the highest overlap in postnatal stages, from P5 to P21, suggesting a window of Lingo-1/NgR1/p75 complex activity in a period critical for CNS maturation and myelination (e.g., McGee et al., 2005). It remains to be determined whether the Lingo-1 knock out is able to respond differently to axonal damage (Mi et al., 2005). Although Lingo-1 mRNA and protein are induced in the ventral horn 7–

14 days after spinal cord lesions (Mi et al., 2004) and antagonizing Lingo-1 can reverse myelin inhibition upon damage in rats, no changes in Lingo-1 expression could be seen after cortico-spinal injury in wild type mice (Barrette et al., 2007). Given the high conservation of Lingo-1 this may point either to differences in the experimental lesion protocol or, less likely, to species specific differences in regenerative behavior. On the other hand, Lingo-1 may participate in the protracted NgR1-independent inhibition described recently in chronic lesion (Chivatakarn et al., 2007) or in modulating different myelin inhibitory receptors (Venkatesh et al., 2007).

An Intrinsic Signal Transduction Function for Lingo-1 Mediated by its Intracellular Domain?

Deletion of the intracellular domain of Lingo-1 transforms the molecule into a dominant negative form. The dominant negative effect may be explained by interference with the stoichiometry of the receptor complex. As our results suggest, the complexes are still formed, but loss of the intracellular domain of Lingo-1 may interfere with signaling. It has been shown that Lingo-1 forms homo-tetramers (Mosyak et al., 2006) and it is possible that overexpression of the deleted form leads to formation of dysfunctional heterotetramers with disrupted signaling properties, while it is still able to interact with p75 and NgR1.

Given that NgR1 has no intracellular component, it has been proposed that it acts as a decoy to bind NogoA, MAG, or Omgp but that the signal transduction is effected by p75 or TROY (Mi et al., 2004; Shao et al., 2005). Our results would bring in a putative and interesting signaling mechanism to the already well-defined contribution of p75 and TROY by incorporating a second signal transduction function mediated by the intracellular portion of Lingo-1. As indicated, Lingo-1 expressed in cells lacking NgR1 and p75 could therefore have other signaling activities independent of myelin inhibitory ligands and not exclusively related to preventing axonal regeneration. Although the C-terminal tail is fairly short this hypothesis deserves further study given the strong biochemical and phenotypic effects caused by deleting this domain. In support of such a role, the Lingo-1 paralogues have a putative tyrosine kinase phosphorylation site that is conserved in Lingo-1-3, but not LERN-4, although phosphorylation of this tyrosine residue *in vivo* has not yet been shown.

Importantly, here we show that the C-terminal domain is able to interact with the zinc finger transcription factor Myt11 (Kim et al., 1997; Weiner and

Chun, 1997). Although the relevance of this interaction *in vivo* needs to be determined, it is interesting to notice that Myt11 protein levels in the cytoplasm increase under regenerating conditions in the spinal cord (Wrathall et al., 1998), when Lingo-1 levels also have been shown to increase (Mi et al., 2004). Two possible modes of action could be proposed: first, Lingo-1 could interact with Myt11 in well defined conditions to regulate its transcription factor activity by retaining it in the cytoplasm; second, Lingo-1 could transduce intracellular signals by docking additional Myt11 cofactors or modifying enzymes. It is tempting to imagine a scenario where an interaction of Lingo-1 with Myt11 in neurons could be paralleled by a similar interaction between Lingo-1 and Myt1, the better known homologue of Myt11, which is expressed in oligodendrocytes (Kim and Hudson, 1992; Kim et al., 1997). In the light of the premature oligodendrocyte differentiation phenotype and advanced myelination showed by the Lingo-1 knock out (Mi et al., 2005), it can be hypothesized that Lingo-1 is preventing differentiation by inhibiting Myt1 activation of target genes such as or proteolipid protein (PLP) (Kim and Hudson, 1992), a major constituent of myelin. Our observation of loss of Lingo-1 expression in differentiating oligodendrocytes in parallel to the appearance of the myelinating potential would be compatible with this hypothesis.

At the earliest stages in neural development, Myt1 has been also implicated in neurogenesis as a key modulator of neurogenic zinc finger transcription factors in association with the Notch pathway (Bellefroid et al., 1996). It is relevant to notice that levels of Lingo1 are increased in adult neurogenic regions (e.g., dentate gyrus of hippocampus) after mitogenic stimuli (i.e., BDNF or kainic acid injections) (Trifunovski et al., 2004). Thus, Lingo-1 may play roles in neural cell specification or proliferation by regulating Myt1 and Myt11, and prior to myelination by modulating Myt1 and actively preventing terminal oligodendrocyte differentiation. Since Lingo-1 expression in oligodendrocytes and neurons has been shown to be necessary for preventing myelination (Ji et al., 2006; Lee, 2007 no. 39), we believe that the hypothesis that its effects are mediated via Myt1 and Myt11 in oligodendrocytes and neurons, respectively warrants further study.

An emerging super-family of proteins containing leucine-rich repeats (LRR) with similar structure to Lingo-1 is beginning to become well studied. Although the roles of many of these genes remain to be determined, some of the super-family members are involved in cell adhesion and neurite outgrowth (Chen et al., 2006). Expression changes associated to

pathological conditions, neurodegeneration, demyelination, as well as recovery after such processes, together with the finding of mutations associated to neuroblastoma and neurological diseases, indicate that these genes have critical functions for central nervous system development and homeostasis, which extend from the proposed roles in preventing axon regeneration after injury (Chen et al., 2006). In this regard, recent findings support an involvement of Lingo-1 in neurodegenerative processes including Parkinson's disease (Inoue et al., 2007), demyelinating disease (Mi et al., 2007) and Alzheimer's disease (Bai et al., 2007) pointing to the use of Lingo-1 inhibitors as new and promising neuroprotective drugs. Understanding the basic biology of Lingo-1 will be key to designing effective therapies.

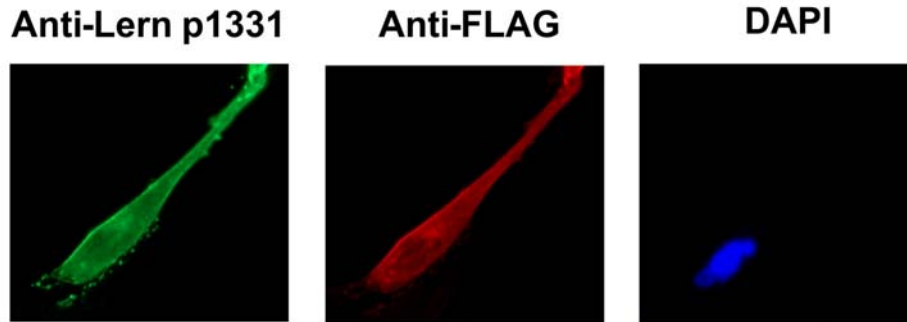
We wish to thank Lynn D. Hudson (NIMDS NIH, Bethesda, MD, USA) for the gift of anti-Myt1l antibody, Ana Marina Mosquera for technical assistance in RNA quality control, Belén Miñana for advice on primer design and setup and analysis of qRT-PCR experiments and Ana Andrés and the Antibody Production Service at the Institute of Biotechnology and Biomedicine, at the Autonomous University of Barcelona, for assistance in polyclonal antibody purification and the microscopy service at Parc Científic de Barcelona for assistance in confocal microscopy.

REFERENCES

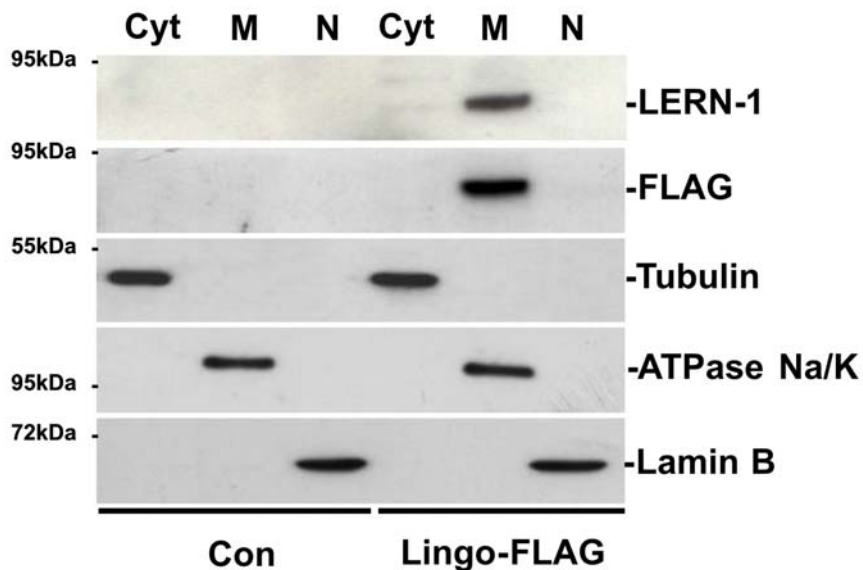
- Bai Y, Markham K, Chen F, Weerasekera R, Watts J, Home P, Wakutani Y, et al. 2007. The in vivo brain interactome of the amyloid precursor protein. *Mol Cell Proteomics* 0:M7000077-MCP200. Epub ahead of print.
- Barrette B, Vallières N, Dube M, Lacroix S. 2007. Expression profile of receptors for myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the intact and injured mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 34: 519–38.
- Barton WA, Liu BP, Tzvetkova D, Jeffrey PD, Fournier AE, Sah D, Cate R, et al. 2003. Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *EMBO J* 22:3291–3302.
- Bellefroid EJ, Bourguignon C, Hollemann T, Ma Q, Anderson DJ, Kintner C, Pieler T. 1996. X-Myt1, a *Xenopus* C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell* 87:1191–1202.
- Carim-Todd L. 2004. Anàlisi transcripcional de 15q24-q26: Caracterització d'un nou gen expressat al sistema límbic, LRRN6A/LERN1. In: Doctoral Thesis, Departament de Genètica. Barcelona, Spain: Universitat de Barcelona. p 205.
- Carim-Todd L, Escarceller M, Estivill X, Sumoy L. 2003. LRRN6A/LERN1 (leucine-rich repeat neuronal protein 1), a novel gene with enriched expression in limbic system and neocortex. *Eur J Neurosci* 18:3167–3182.
- Chao MV. 1994. The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 25:1373–1385.
- Chen Y, Aulia S, Li L, Tang BL. 2006. AMIGO and friends: An emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs. *Brain Res Rev* 51:265–274.
- Chivatakarn O, Kaneko S, He Z, Tessier-Lavigne M, Giger RJ. 2007. The Nogo-66 receptor NgR1 is required only for the acute growth cone-collapsing but not the chronic growth-inhibitory actions of myelin inhibitors. *J Neurosci* 27:7117–7124.
- Eby MT, Jasmin A, Kumar A, Sharma K, Chaudhary PM. 2000. TAJ, a novel member of the tumor necrosis factor receptor family, activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and mediates caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 275:15336–15342.
- Filbin MT. 1996. The muddle with MAG. *Mol Cell Neurosci* 8:84–92.
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. 2001. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409:341–346.
- Gil V, Nicolas O, Mingorance A, Urena JM, Tang BL, Hirata T, Saez-Valero J, et al. 2006. Nogo-A expression in the human hippocampus in normal aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:433–444.
- Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, et al. 1999. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98:739–755.
- Hunt D, Coffin RS, Anderson PN. 2002a. The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review. *J Neurocytol* 31:93–120.
- Hunt D, Mason MR, Campbell G, Coffin R, Anderson PN. 2002b. Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons. *Mol Cell Neurosci* 20:537–552.
- Inoue H, Lin L, Lee X, Shao Z, Mendes S, Snodgrass-Belt P, Sweigard H, et al. 2007. Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14430–14435.
- Ji B, Li M, Wu WT, Yick LW, Lee X, Shao Z, Wang J, et al. 2006. LINGO-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci* 33:311–320.
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Dimou L, Lin S, Fergani A, Ruegg MA, Schwab ME, et al. 2006. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* 7: 1162–1167.
- Josephson A, Trifunovski A, Scheele C, Widenfalk J, Wahlestedt C, Brene S, Olson L, et al. 2003. Activity-induced and developmental downregulation of the Nogo receptor. *Cell Tissue Res* 311:333–342.
- Josephson A, Trifunovski A, Widmer HR, Widenfalk J, Olson L, Spenger C. 2002. Nogo-receptor gene activity: Cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. *J Comp Neurol* 453:292–304.

- Karnezis T, Mandemakers W, McQualter JL, Zheng B, Ho PP, Jordan KA, Murray BM, et al. 2004. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Neurosci* 7:736–744.
- Kim JE, Li S, GrandPre T, Qiu D, Strittmatter SM. 2003. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron* 38:187–199.
- Kim JG, Armstrong RC, v Agoston D, Robinsky A, Wiese C, Nagle J, Hudson LD. 1997. Myelin transcription factor 1 (Myt1) of the oligodendrocyte lineage, along with a closely related CCHC zinc finger, is expressed in developing neurons in the mammalian central nervous system. *J Neurosci Res* 50:272–290.
- Kim JG, Hudson LD. 1992. Novel member of the zinc finger superfamily: A C2-HC finger that recognizes a glia-specific gene. *Mol Cell Biol* 12:5632–5639.
- Lauren J, Airaksinen MS, Saarna M, Timmusk T. 2003. Two novel mammalian Nogo receptor homologs differentially expressed in the central and peripheral nervous systems. *Mol Cell Neurosci* 24:581–594.
- Lee JK, Kim JE, Sivula M, Strittmatter SM. 2004. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J Neurosci* 24:6209–6217.
- Lee X, Yang Z, Shao Z, Rosenberg SS, Levesque M, Pepinsky RB, Qiu M, et al. 2007. NGF regulates the expression of axonal LINGO-1 to inhibit oligodendrocyte differentiation and myelination. *J Neurosci* 27:220–225.
- McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW, Strittmatter SM. 2005. Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science* 309:2222–2226.
- Mi S, Hu B, Hahm K, Luo Y, Kam Hui ES, Yuan Q, Wong WM, et al. 2007. LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 13:1228–1233.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, et al. 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 7:221–228.
- Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulag-Morskaya S, Shao Z, Chang J, et al. 2005. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 8:745–751.
- Mingorance A, Fontana X, Sole M, Burgaya F, Urena JM, Teng FY, Tang BL, et al. 2004. Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Mol Cell Neurosci* 26:34–49.
- Mingorance A, Fontana X, Soriano E, Del Rio JA. 2005. Overexpression of myelin-associated glycoprotein after axotomy of the perforant pathway. *Mol Cell Neurosci* 29:471–483.
- Mingorance-Le Meur A, Zheng B, Soriano E, Del Rio JA. 2007. Involvement of the myelin-associated inhibitor Nogo-A in early cortical development and neuronal maturation. *Cereb Cortex* 17:2375–2386.
- Mosyak L, Wood A, Dwyer B, Buddha M, Johnson M, Aulabaugh A, Zhong X, et al. 2006. The structure of the Lingo-1 ectodomain, a module implicated in CNS repair inhibition. *J Biol Chem* 281:36378–36390.
- Nie DY, Ma QH, Law JW, Chia CP, Dhingra NK, Shimoda Y, Yang WL, et al. 2006. Oligodendrocytes regulate formation of nodes of Ranvier via the recognition molecule OMgp. *Neuron Glia Biol* 2:151–164.
- Novak G, Talerico T. 2006. Nogo A, B and C expression in schizophrenia, depression and bipolar frontal cortex, and correlation of Nogo expression with CAA/TATC polymorphism in 3'-UTR. *Brain Res* 1120:161–171.
- Okafuji T, Tanaka H. 2005. Expression pattern of LINGO-1 in the developing nervous system of the chick embryo. *Gene Expr Patterns* 6:57–62.
- Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL, Garcia KC, et al. 2005. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 45:345–351.
- Park JH, Gimbel DA, GrandPre T, Lee JK, Kim JE, Li W, Lee DH, et al. 2006. Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *J Neurosci* 26:1386–1395.
- Pignot V, Hein AE, Barske C, Wiessner C, Walmsley AR, Kaupmann K, Mayeur H, et al. 2003. Characterization of two novel proteins, Ng RH1 and Ng RH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *J Neurochem* 85:717–728.
- Rossi FM, Sala R, Maffei L. 2002. Expression of the nerve growth factor receptors TrkA and p75NTR in the visual cortex of the rat: Development and regulation by the cholinergic input. *J Neurosci* 22:912–919.
- Rutherford LC, DeWan A, Lauer HM, Turrigiano GG. 1997. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci* 17:4527–4535.
- Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H. 2007. TROY and LINGO-1 expression in astrocytes and macrophages/microglia in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:99–107.
- Shao Z, Browning JL, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, Thill G, et al. 2005. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron* 45:353–359.
- Simonon M, Pedersen V, Weinmann O, Schnell L, Buss A, Ledermann B, Christ F, et al. 2003. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* 38:201–211.
- Strittmatter SM. 2002. Modulation of axonal regeneration in neurodegenerative disease: Focus on Nogo. *J Mol Neurosci* 19:117–121.
- Teng FY, Tang BL. 2005. Nogo signaling and non-physical injury-induced nervous system pathology. *J Neurosci Res* 79:273–278.
- Trifunovski A, Josephson A, Ringman A, Brene S, Spenger C, Olson L. 2004. Neuronal activity-induced regulation of Lingo-1. *Neuroreport* 15:2397–2400.
- Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, Mage R, et al. 2005. The Nogo-66 receptor homolog Ngr2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci* 25:808–822.

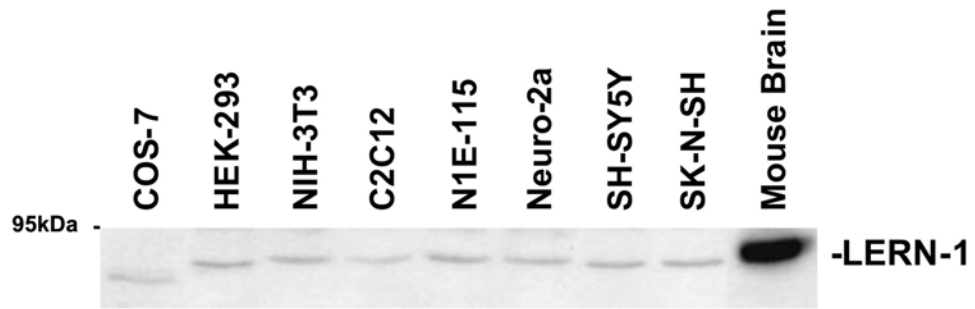
- Venkatesh K, Chivatakarn O, Sheu SS, Giger RJ. 2007. Molecular dissection of the myelin-associated glycoprotein receptor complex reveals cell type-specific mechanisms for neurite outgrowth inhibition. *J Cell Biol* 177:393–399.
- Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA. 2006. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* 124:573–586.
- Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z. 2002. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo. MAG and OMgp. *Nature* 420:74–78.
- Weiner JA, Chun J. 1997. Png-1, a nervous system-specific zinc finger gene, identifies regions containing postmitotic neurons during mammalian embryonic development. *J Comp Neurol* 381:130–142.
- Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM. 2002. A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 5:1302–1308.
- Wrathall JR, Li W, Hudson LD. 1998. Myelin gene expression after experimental contusive spinal cord injury. *J Neurosci* 18:8780–8793.
- Yamashita T, Fujitani M, Yamagishi S, Hata K, Mimura F. 2005. Multiple signals regulate axon regeneration through the nogo receptor complex. *Mol Neurobiol* 32:105–111.
- Yamashita T, Tohyama M. 2003. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6:461–467.
- Zheng B, Atwal J, Ho C, Case L, He XL, Garcia KC, Steward O, et al. 2005. Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1205–1210.
- Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O, Tessier-Lavigne M. 2003. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 38:213–224.



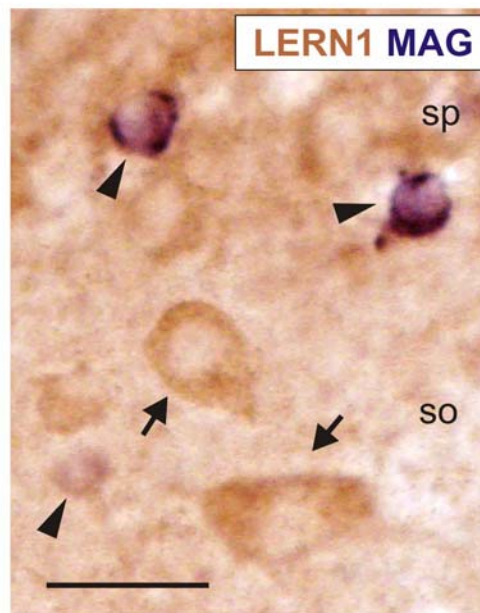
Supplementary Figure 1. Validation of polyclonal antibody reagents by immunofluorescence. SK-N-SH cells transfected with full length Lingo-1 fused to the FLAG epitope tag were processed to reveal the distribution of the epitopes recognized by the anti-Lern1 p1331 and anti-FLAG antibodies after overexpressing the fusion protein. Membrane expression can be seen with a total overlap in distribution. DAPI stain recognizes nuclei in the right panel. Untransfected cells show neither of the two immunoreactivities (Data not shown).



Supplementary Figure 2. Subcellular localization of Lingo-1 to membrane compartments. Western-blot analysis of N1E-115 neuroblastoma cells transfected with ptag4-Lingo-1-FLAG of subcellular fractions. Separation of nuclear, cytosolic and membrane extracts was carried out with the Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Samples were analyzed by SDS-PAGE, transferred on to PVDF membranes and processed for detection with anti-Lingo-1 and anti-FLAG antibodies. Tubulin (cytoplasm), ATPase Na/K (membrane) and Lamin B (nucleus) were used as subcellular control markers.



Supplementary Figure 3. Analysis of the expression of Lingo-1 in cell lines. Analysis of the expression of endogenous Lingo-1 protein from several cell culture lines compared with adult mouse brain by Western-blot.



Supplementary Figure 4. Lack of Lingo-1 expression in myelinating MAG+ oligodendrocytes. High power photomicrographs illustrating the absence of colocalization between Lingo-1 protein (arrows) and MAG (arrowheads) *in situ* hybridization signal in double processed sections (see material and methods for details).

Patrón de expresión de OMgp durante el desarrollo del telencéfalo de ratón

Vanessa Gil, Zoe Bichler, Jae K. Lee, Óscar Seira, Franc Llorens, Ana Bribián, Ricardo Morales, Enric Claverol-Tinturé, Eduardo Soriano, Lauro Sumoy, Binhai Zheng y José Antonio del Río.

Resumen

La proteína OMgp es una proteína unida por dominio GPI a la membrana de neuronas y oligodendrocitos del SNC. Se han realizado numerosos estudios para averiguar las funciones de las proteínas inhibitorias asociadas a mielina (MAIPs) en procesos de neurodegeneración y tras lesión en el adulto. Sin embargo, aún no se ha establecido el papel que estas proteínas y sus receptores puedan tener durante el desarrollo. Estudios recientes indican que NgR1 y el receptor recientemente descrito, PirB, restringen la plasticidad sináptica cortical, aunque se desconocen los factores que desencadenan estos efectos. Puesto que Nogo-A se expresa principalmente en RE y la expresión de MAG no acontece hasta estadios tardíos del desarrollo, se debería de considerar la posible función de OMgp en tales procesos. En el presente trabajo, analizamos el patrón de expresión de la proteína OMgp durante el desarrollo del telencéfalo de ratón. La aparición de la inmunoreactividad en la corteza durante el desarrollo coincide con el establecimiento de la conexión tálamo-cortical y, por tanto, de la formación de los barriles (*barrel-field*) de la corteza. A nivel celular, OMgp se localiza en membranas neuronales de dendritas y axones y también en fracciones sinaptosomales de cerebro y en estructuras similares a botones sinápticos. Por último, el análisis del *barrel-field* en ratones deficientes en OMgp revela que, aunque la conexión tálamo-cortical está formada, el destino final de numerosos axones talámicos está alterado ya que invaden ectópicamente las capas II-III de corteza en lugar de la capa IV. Nuestros datos refuerzan la idea de que la expresión temprana de las proteínas asociadas a mielina juega un importante papel durante el desarrollo y apuntan una participación de OMgp en el establecimiento de la conexión tálamo-cortical.

Developmental Expression of the Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein in the Mouse Telencephalon

Vanessa Gil^{1,2,3}, Zoe Bichler^{1,2,3}, Jae K. Lee⁴, Oscar Seira^{1,2,3}, Franc Llorens^{1,2,3}, Ana Bribian^{1,2,3}, Ricardo Morales⁵, Enric Claverol-Tinture⁵, Eduardo Soriano^{3,6}, Lauro Sumoy⁷, Binhai Zheng⁴ and Jose A. del Río^{1,2,3}

¹Molecular and Cellular Neurobiotechnology laboratory, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona E-08028, Spain, ²Cellular and Molecular Basis of Neurodegeneration and Neurorepair (CMBNN), Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain, ³Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid E-28031, Spain, ⁴Department of Neurosciences, University of California, San Diego, CA 92093-0691, USA, ⁵Neuroengineering group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona E-08028, Spain, ⁶Neurobiology of Development and Regeneration Laboratory, Institute for Research in Biomedicine of Barcelona and Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain and ⁷Institute of Predictive and Personalized Medicine of Cancer, Badalona E-08916, Spain

The oligodendrocyte myelin glycoprotein is a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein expressed by neurons and oligodendrocytes in the central nervous system. Attempts have been made to identify the functions of the myelin-associated inhibitory proteins (MAIPs) after axonal lesion or in neurodegeneration. However, the developmental roles of some of these proteins and their receptors remain elusive. Recent studies indicate that NgR1 and the recently discovered receptor PirB restrict cortical synaptic plasticity. However, the putative factors that trigger these effects are unknown. Because Nogo-A is mostly associated with the endoplasmic reticulum and myelin associated glycoprotein appears late during development, the putative participation of OMgp should be considered. Here, we examine the pattern of development of OMgp immunoreactive elements during mouse telencephalic development. OMgp immunoreactivity in the developing cortex follows the establishment of the thalamo-cortical barrel field. At the cellular level, we located OMgp neuronal membranes in dendrites and axons as well as in brain synaptosome fractions and axon varicosities. Lastly, the analysis of the barrel field in OMgp-deficient mice revealed that although thalamo-cortical connections were formed, their targeting in layer IV was altered, and numerous axons ectopically invaded layers II–III. Our data support the idea that early expressed MAIPs play an active role during development and point to OMgp participating in thalamo-cortical connections.

Keywords: axon plasticity, barrel-field specification, cortical lamination, myelin

Introduction

The oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein expressed by neurons and oligodendrocytes in the central nervous system (CNS) (Habib et al. 1998; Wang et al. 2002). Pioneer genomic studies reported that the *omgp* gene is located within intron 27b of the mouse *NF1* gene, which encodes to Neurofibromin, a RasGAP protein, which, when mutated leads to neurofibromatosis type 1 (NF1) disease (Mikol, Alexakos et al. 1990). NF1-deficient mice display deficits in cortical development (especially in the development of the neocortical barrel field) (Lush et al. 2008). However, although function in adult in normal and neural

degeneration is revealed, OMgp functions during development remain to be established.

OMgp belongs to a group of molecules located in CNS myelin protein fractions, with axon outgrowth inhibitory activity (Kottis et al. 2002; Wang et al. 2002). This group also includes Nogo-A (GrandPre et al. 2000; Huber and Schwab 2000; Prinjha et al. 2000) and myelin associated glycoprotein (MAG) (McKerracher et al. 1994; Mukhopadhyay et al. 1994). All 3 proteins may act via the same receptor, the Nogo receptor (NgR1) (Fournier et al. 2001; Fujitani et al. 2005) or its paralogues (NgR2 and/or NgR3) or the recently identified PirB (paired immunoglobulin-like receptor B) (Barton et al. 2003; Lauren et al. 2003; Pignot et al. 2003; Venkatesh et al. 2005; Atwal et al. 2008). The participation and physiology of PirB is not fully known. However, NgR1 may form a complex with either p75^{NGFR} (Domeniconi et al. 2002; Hu et al. 2002) or TROY (Domeniconi and Filbin 2005; Shao et al. 2005), which would transduce intracellular signals by activating RhoA (Yamashita and Tohyama 2003; Domeniconi and Filbin 2005; Shao et al. 2005). In addition, NgR1 may also interact with another coreceptor, Lingo-1 (Mi et al. 2004; Llorens et al. 2008), which mediates intracellular signaling through the serine-threonine kinase WNK1 (Zhang et al. 2009). Subsequent studies pointed out that ligands and their receptors may play crucial roles after lesion or in neurodegenerative diseases (e.g., Fournier et al. 2002; Karnezis et al. 2004; Teng and Tang 2005; Gil et al. 2006; Jokic et al. 2006; Park et al. 2006) or following alcohol abuse (Okamoto et al. 2006). However, although these myelin-associated inhibitory proteins (MAIPs) are widely expressed in the adult CNS, emerging data indicate that some of them may play additional roles at early stages of brain development, because they are expressed before NgR1 and long before the onset of brain myelination. A recent example has been reported for Nogo-A with high neuronal expression and different roles during neuronal migration, neurite formation, or oligodendrocyte maturation in the developing telencephalon (Mingorance-Le Meur et al. 2007; Zhao et al. 2007; Perner et al. 2008). Another example is Lingo-1 (a coreceptor of NgR1, Carim-Todd et al. 2003; Mi et al. 2004), which can also bind to the postmitotic neuron-specific zinc finger protein Myt11 (Llorens et al. 2008).

In the studies of Habib et al. and Vourc'h et al., *omgp* expression was analyzed during postnatal development, but earlier developmental stages were not studied.

Although oligodendrocyte expression of OMgp occurs at nodes of Ranvier with distinct roles in regulating nodal formation and function during CNS myelination (Apostolski et al. 1994; Huang et al. 2005; Nie et al. 2006), several studies suggest that OMgp is mainly a neuronal protein, which is also expressed in oligodendrocytes (Habib et al. 1998; Hunt, Coffin, and Anderson 2002; Koyama et al. 2008). However, the functions of neuronal OMgp during development have not been fully explored. Here, we examined the pattern of OMgp expression in the embryonic mouse forebrain using a well-characterized antibody, paying special attention to neurons. In addition, the cellular distribution and expression changes of neuronal OMgp protein were analyzed *in vivo* and *in vitro*. We report that neuronal OMgp is present at early stages of development (from E14), localized in the growing axons during axonal tract formation following the maturation of cortical connections (e.g., perforant pathway and thalamo-cortical projection). In addition, subsets of hippocampal interneurons express OMgp in the adult stages. At the cellular level, OMgp is present in the neuronal membrane, synaptosomal fractions, and axonal varicosities in primary hippocampal cultures. Lastly, the role of OMgp in the organization of thalamo-cortical connections was analyzed in *omgp*^{-/-} mice. The barrel field of *omgp*^{-/-} mice was altered, and ectopic thalamic axons were seen in layers II-III. Taken together, our data provide a detailed characterization of the OMgp protein expression in the embryonic mouse telencephalon and indicate that OMgp has a role in axonal target specification and synaptic plasticity.

Materials and Methods

Animals

All animal experiments were carried out in accordance with the guidelines of the European Union (2003/65/CE) and current Spanish regulations (BOE 252/34367-91, 2005) for the use of laboratory animals. All experimental protocols were also approved by the local Ethical Committee. A total of 30 pregnant OF1 mice (Iffa Credo) were used. The morning of plug detection was considered as embryonic day 0 (E0) and the day of birth as postnatal day 0 (P0). Animals were killed at the following stages: E14, E16, P0, P5, P7, P10, P15, P21, and adults. Six to 12 animals (from 2 or more different litters) were used for each stage. In addition, 5 *omgp*^{-/-} mice (stage P7) from 2 different litters were also used. *omgp*^{-/-} mice were generated in the laboratory of Binhai Zheng (University of California, San Diego, CA). A detailed description of gene targeting at OMgp has recently been published (Lee et al. 2009). Briefly, the second exon, which contains all the coding sequence of the OMgp, is deleted, resulting in a null allele. This deletion does not interfere with NF1 expression (see below).

Antibodies

The following primary antibodies were used: OMgp (goat polyclonal, AF1674, R&D Systems, MN, 1:3000 for immunohistochemistry (IHC), 1:200 for immunofluorescence (IF), and 1:1000 for Western blot), Nogo-A (rabbit polyclonal, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), myelin basic protein (MBP, mouse monoclonal, 1:500, Chemicon, Temecula, CA), neuron-specific β -III Tubulin (mouse monoclonal, 1:2000, Sigma, St Louis, MO), Calbindin-28 kDa (CALB, rabbit polyclonal, 1:5000, Swant, Bellinzona, Switzerland), Calretinin (rabbit polyclonal, 1:500, Swant), CCK (rabbit polyclonal, 1:100, CRB, Cleveland, United Kingdom), Parvalbumin (rabbit polyclonal, 1:250, Swant), Somatostatin (SOM, rabbit polyclonal, 1:5000, Swant), SNAP-25 (SMI81, mouse monoclonal, 1:5000, Covance, Princeton, NJ), Syntaxin 1 (mouse

monoclonal, clone HPC-1, 1:5000, Sigma), Synaptophysin (mouse monoclonal, 1:1000, Dako, Glostrup, Denmark), Synapsin (rabbit polyclonal, 1:1000, Synaptics System, Goettingen, Germany), MAP2 (mouse monoclonal, 1:200, Sigma), Actin (mouse monoclonal, 1:1000, Chemicon), serotonin (5-HT) transporter (602-622) (5-HTT, rabbit polyclonal, 1:1000, Calbiochem, Gibbstown, NJ), HNK-1(412) (rat monoclonal, 1:500, kindly provided by Prof Melitta Schachner), HNK-1 (clone VC1.1, mouse monoclonal, 1:2000, Sigma), and Neurofibromin (NF1) (rabbit polyclonal, SC-67, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology).

Preparation of Adult Brain Myelin

CNS myelin was isolated following the procedure described by Norton and Poduslo (1973). Briefly, adult Sprague-Dawley rat brains were homogenized in 0.32 M sucrose at 4 °C in a Dounce homogenizer. This homogenate was layered over 0.85 M sucrose solution and centrifuged at 25 000 rpm for 30 min. The CNS myelin at the interface of the 2 sucrose layers was collected in water and centrifuged at 25 000 rpm for 15 min. The resultant pellet was obtained, collected in water, and centrifuged at 10 000 rpm for 10 min twice. The white pellet was then suspended in 0.32 M sucrose, and the initial gradient was replicated as described previously. Finally, the myelin was removed from the interface and washed in water and spun at 25 000 rpm for 10 min to remove sucrose. The final pellet was freeze dried overnight, and protein content was determined using the bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Rockford, IL).

Cell Transfection and OMgp Detection

EBNA-293T cells were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine, and antibiotics (all purchased from GIBCO Life Technologies, Paisley, United Kingdom). Cells were grown in 35-mm ϕ 6-well multiplates (Nunc, Roskilde, Denmark) containing 10 mm ϕ glass coverslips to 60–70% confluence and transfected with pCMV-SPORT6-OMgp (full-length cDNA clone IRAP968C0766D purchased from RZPD, Germany) using Lipofectamine-Plus reagents according to the manufacturer's instructions (GIBCO Life Technologies). Seventy-two hours later, cells were scraped and harvested in Laemmli sample buffer. Cell extracts were separated by 8% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), electrotransferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted with OMgp antibody. In parallel, protein samples of total adult brain and myelin extract were also included in the experiment as controls.

Immunohistochemical Methods

For IHC, fetuses were removed by caesarean section after deep anesthesia of the mother with chloral hydrate (3.5 mg/kg i.p. injection) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1M phosphate buffered saline (PBS). Postnatal mice were anesthetized with chloral hydrate and perfused. After perfusion, brains were removed and postfixed in the same solution for 12 h, cryoprotected in 30% sucrose, and sectioned on a freezing microtome (Leica, Wetzlar, Germany) (50 μ m thick for E16 and 30 μ m for P0 adult). They were then processed for the immunocytochemical detection of OMgp following an immunoperoxidase protocol. Briefly, free-floating sections from different developmental stages were processed in parallel. Free-floating sections were rinsed in 0.1 M PBS and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 3% H₂O₂ and 10% methanol dissolved in 0.1 M PBS. After extensive rinsing, sections were incubated in 0.1 M PBS containing 0.2% gelatin, 10% normal goat serum, 0.2% glycine, and 0.2% Triton X-100 for 1 h at room temperature. Afterward, sections were incubated for 36 h at 4 °C with the primary antibody. Thereafter, sections were incubated with secondary biotinylated antibodies (2 h, 1:200 diluted) and Streptavidin-Horseradish peroxidase complex (2 h, 1:400 diluted). Peroxidase activity was revealed with 0.025% diaminobenzidine (DAB) and 0.003% hydrogen peroxide. After rinsing, sections were mounted onto slides, dehydrated, and coverslipped with Bukitt (Merck, Darmstadt, Germany). In embryonic stages, the peroxidase activity was developed following the intensification method of Hancock (1986), using DAB-nickel ammonium sulfate as chromogen. Immunocytochemical controls,

including omission of the primary antibody or its replacement by normal serum, prevented immunostaining.

To characterize OMgp expression in adult hippocampal interneurons, additional sections from p21-adult brains were processed for double IF detection of OMgp and several markers of local circuit neurons, such as Calbindin, Parvalbumin, and Calretinin, or neuropeptides (CCK and SOM) by using Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 568-tagged secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR). Sections were mounted on Fluoromount (Vector Labs, Burlingame, CA) and analyzed on an Olympus Fluoview SV 500 confocal microscope. All images were obtained in sequential-scanning laser mode to avoid fluorochrome crossexcitation.

To determine differences between *omgp*^{-/-} and *omgp*^{+/+} cortical barrel fields, coronal sections of P7 pups were processed in parallel in blind experiments. After genotype identification by Western blotting, the parietal cortex was photodocumented using an Olympus BX61 microscope equipped with a cooled digital DP72L camera. Pictures were densitometrically analyzed using the Image-J software (NIH, United States). Brightness and contrast were calibrated in each picture using a pseudocolor lookup table (Rainbow RGB LUT) settled between 108 (background) and 248 (maximum) gray scale values.

Western Blotting Techniques

Mice were anesthetized, their brains were dissected out, and the telencephalic portion was homogenized on ice in homogenization buffer containing 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10% glycerol, 1% Triton X-100, and 1× protease inhibitor cocktail. The homogenate was clarified by centrifugation at 13 000 × g for 15 min, and the protein content of soluble fractions was determined using the Bio-Rad detergent-compatible assay. Tissue extracts (30 µg) were boiled in Laemmli sample buffer at 100 °C for 10 min, followed by 8% SDS-PAGE, and electrotransferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, England, United Kingdom). Following transfer, membranes were incubated overnight at 4 °C with α-OMgp antibody, α-Nogo-A or α-MBP, and α-Tubulin to ensure equal amounts of protein in all samples. Membranes were subsequently incubated with peroxidase-tagged secondary antibodies (α-IgG raised in goat, rabbit, or mouse, respectively, Dako), and peroxidase activity was visualized using the ECL-plus kit (Amersham Biosciences). Cell extracts from OMgp-transfected EBNA-293T cells were used as an internal control.

Primary Neuronal Cultures and Immunocytochemical Methods

E16 mouse brains were dissected in PBS containing 0.6% glucose, and the hippocampus was dissected out. After gentle trypsinization, tissue pieces were dissociated by gentle sweeping. Cells were then counted and seeded onto poly-L-lysine-coated coverslips in Neurobasal medium containing B27 supplement (GIBCO Life Technologies). Cells were cultured for 7 days. Coverslips were fixed in 2% buffered paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100 in 0.1 M PBS, and blocked with 10% normal serum in 0.1 M PBS. Cells were sequentially incubated overnight with primary antibodies at 4 °C and then with Alexa Fluor-tagged secondary antibodies for 2 h. After rinsing in PBS, cells were stained with Bisbenzimidazole (Hoescht 32444, 1 µM in 0.1 M PBS, for 10 min), rinsed, mounted on Fluoromount (Vector Labs), and analyzed with a confocal microscope (TCS SP1, Leica). To determine whether hippocampal neurons express OMgp, we incubated the cultures with α-OMgp and the neuronal marker α-MAP2 antibodies. To study the colocalization of OMgp with presynaptic markers, we labeled the cultures with α-OMgp and α-Synapsin antibodies.

Synaptosome Subfractionation

Adult-mouse forebrains were homogenized in 30 mL of Sol. A buffer (320 mM sucrose, 5 mM Na-4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)/HCl, pH 7.4) with 10 strokes at 600 rpm in a glass-Teflon homogenizer. The homogenate was centrifuged (5000 rpm, SS34 rotor, for 5 min at 4 °C). The resulting postnuclear supernatant was centrifuged twice at 11 000 rpm (SS34, for 12 min at 4 °C), and the crude synaptosomal fraction was resuspended in 4–8 mL of Sol. A buffer. This sample was layered on top of a discontinuous Ficoll gradient of 12%–

9%–5%. After centrifugation for 35 min at 22 500 rpm in an SW28 rotor (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA), the synaptosomes were collected at the 5–9% and 9–12% interphases and resuspended in 15 mL of Sol. B buffer (10 mM glucose, 5 mM KCl, 140 mM NaCl, 5 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 1.2 mM Na₂HPO₄, and 20 mM HEPES/NaOH, pH 7.4). After centrifugation for 12 min at 11 000 rpm, the pellet was resuspended in 300 µL of Sol. B buffer and 2.7 mL of H₂O. This sample was layered on top of a discontinuous sucrose gradient (0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.6 M, and 1.8 M). Gradients were centrifuged for 3 h at 33,000 rpm in an SW41 rotor (Beckman) and were collected as 0.5-mL fractions. The purity of the fractions was assessed with membrane markers by immunoblotting with α-Syntaxin 1, α-Synaptophysin, and α-SNAP-25 antibodies.

Results

Characterization of α-OMgp Antibody

In this study, we used a commercial α-OMgp antibody from R&D Systems. This antibody was produced in goat immunized with mouse OMgp. However, to further characterize the specificity of the α-OMgp antibody, we transfected EBNA-293T cells with plasmid-encoding mouse OMgp. Immunoblot analysis using the α-OMgp antibody (Fig. 1A) exclusively detected a band of approximately 120–130 kDa in mouse-brain extracts, myelin extracts (see Material and Methods for details) and lysates of OMgp-transfected EBNA-293T cells. Labeling was absent in mock-transfected cells. It has been described that OMgp carries the HNK-1 epitope that is also present in other proteins such as NCAM or MAG (Mikol, Gulcher et al. 1990). To further corroborate that the OMgp antibody used in the present study does not recognize the HNK-1 carbohydrate, adult-brain extracts were immunoblotted using the OMgp antibody and the HNK1 antibody (clone VC1.1, Sigma) (Fig. 1B). The HNK-1(VC1.1) recognizes the HNK-1 epitope in several brain proteins such as NCAM, MAG, and some chondroitin sulfate proteoglycans of different molecular weights. HNK-1(VC1.1) immunoblots render a strong smear labeling at >180–200 kDa and an additional labeling of several bands of less than 150 kDa that were not recognized by the OMgp antibody (Fig. 1B). In addition, to further corroborate these data in tissue sections, coronal brain sections from the same animal were immunostained using the HNK-1(412) and OMgp antibodies (Fig. 1C,D). The pattern of staining was completely different. Specific areas of the telencephalon (e.g., hippocampal fimbria, the anterior commissure, or globus pallidus) were HNK-1(412) positive. In contrast, although cortical layer IV was labeled with OMgp, HNK1(412) labeling was not observed (Fig. 1C,D). Lastly, the OMgp antibody did not label any band in *omgp*^{-/-} derived protein extracts (see below) nor in *omgp*^{-/-} brain sections (data not shown). We conclude that the goat α-OMgp used in the present study only recognized OMgp.

Developmental Expression of OMgp during Brain Development

To determine the expression levels of OMgp during development, we first performed a Western blot analysis of protein extracts from developing telencephalon (Fig. 2). The results were compared with the developmental expression of Nogo-A and the MBP in parallel immunoblots. Immunoblot analysis using the rabbit α-Nogo-A antibody detected a band of approximately 200–210 kDa that decreases from E16 to adult stages (Fig. 2). In parallel immunoblots, a pale band of OMgp

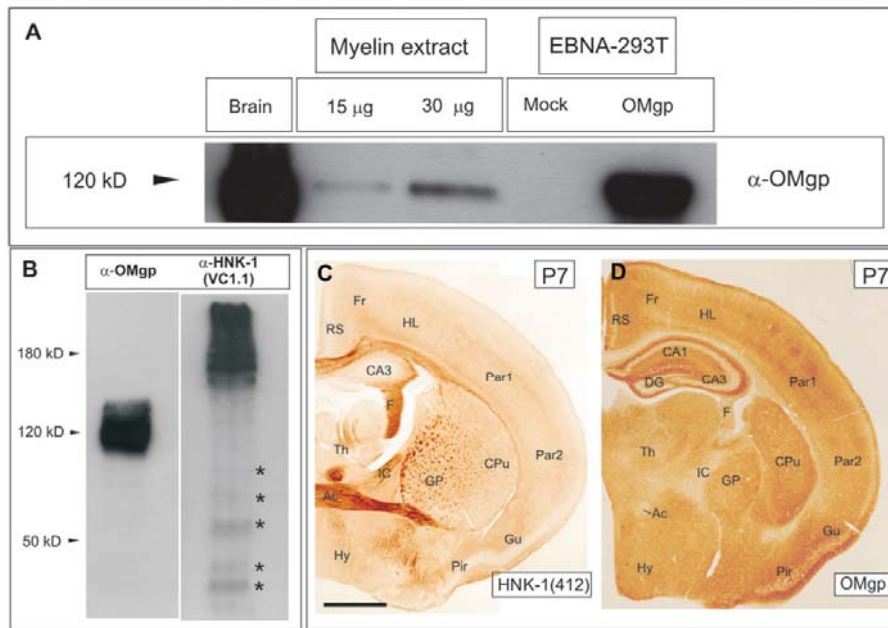


Figure 1. Characterization of α -OMgp antibody. (A) Immunoblot of OMgp using the goat α -OMgp antibody in adult brain protein extracts, purified myelin and protein extracts of OMgp-transfected, and Mock-transfected cells. For SDS-PAGE and Western blotting, 40 μ g of adult- and cell-protein extracts, and 15 and 30 μ g of myelin extract were used. (B) Immunoblot in adult-brain protein extracts using the goat α -OMgp antibody and the HNK-1(VC1.1). Blots with HNK-1 showed a pattern of staining (asterisks) different from those seen in parallel OMgp blots. (C,D) Low-power photomicrographs illustrating HNK-1 (C) and parallel OMgp-staining (D). Notice the different pattern of staining. Scale bar in (C) = 500 μ m also pertains to (D) Abbreviations: Fr, frontal cortex; RS, retrosplenial cortex; CA1-CA3 "cornu ammonis" 1-3; DG, dentate gyrus; F, fimbria; Par1-2, parietal cortex 1 and 2; CPu, caudate putamen; GP, globus pallidus; Th, thalamus; IC, internal capsule; AC, anterior commissure; Hy, hypothalamus; Pir, pyriform cortex; and Gu, gustatory cortex.

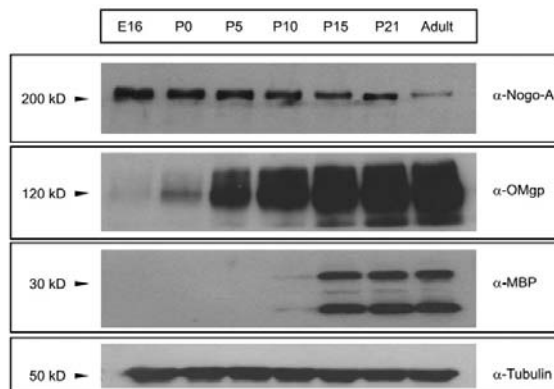


Figure 2. Developmental expression of Nogo-A, OMgp, and MBP in Western Blotting. α -OMgp antibody detected a band in brain samples with an apparent molecular weight of 120-130 kDa. Membranes were reprobed with α -Tubulin antibody for protein standardization. Notice that Nogo-A expression started at E16 and continued until adult stages. A faint OMgp band can be seen at E16 long before the onset of myelination as marked by the first appearance of MBP labeling at P10.

was first seen at E16. OMgp levels increased from P0 onward reaching maximum levels in the adult. Similar postnatal results were reported by Vourc'h et al. (2003) using semiquantitative real time-polymerase chain reaction. In contrast, MBP, a marker of the myelination, was detected only from P10 onward in brain

extracts. In a recent study (Mingorance et al. 2005), we described that the first relevant expression of the MAG, a marker of myelinating oligodendrocytes, appeared at P8-P10 in the cortical white matter, which correlates with MBP expression revealed by immunoblotting. Taken together, our data indicate that OMgp is expressed at embryonic stages long before the onset of the brain myelination, which suggests that OMgp may play additional roles during perinatal development as reported for other MAIPs (e.g., NogoA, Mingorance, Soriano-García, and del Río 2004; Mingorance-Le Meur et al. 2007; Montani, Gerrits, Gehrig, Dimou et al. 2009).

Next, we aimed to corroborate these data by analyzing the protein-expression pattern of OMgp during telencephalic development in brain sections, from E14 until adult stages (Fig. 3). Coronal or longitudinal sections from developmental series were immunohistochemically processed. The antibody mainly labeled neurons, although strong staining was also observed at late postnatal stages in white matter tracks, and labeled oligodendrocytes were identified in longitudinal spinal-cord sections with similar morphologies and localization to those reported in oligodendroglial-like cells in paranodal sections (Huang et al. 2005) (Fig. 3M, see also Fig. 2 of Huang et al., for details).

At E14, OMgp immunoreactivity was almost absent from the mouse telencephalon (Fig. 3A) except for mammillothalamic and mammillothalamic tracts and raphe dorsalis and dorsal thalamus nuclei (data not shown). At E16, OMgp labeling was prominent in the pyriform/entorhinal region (Fig. 3B), and after nickel-intensified DAB intensification, projecting neurons

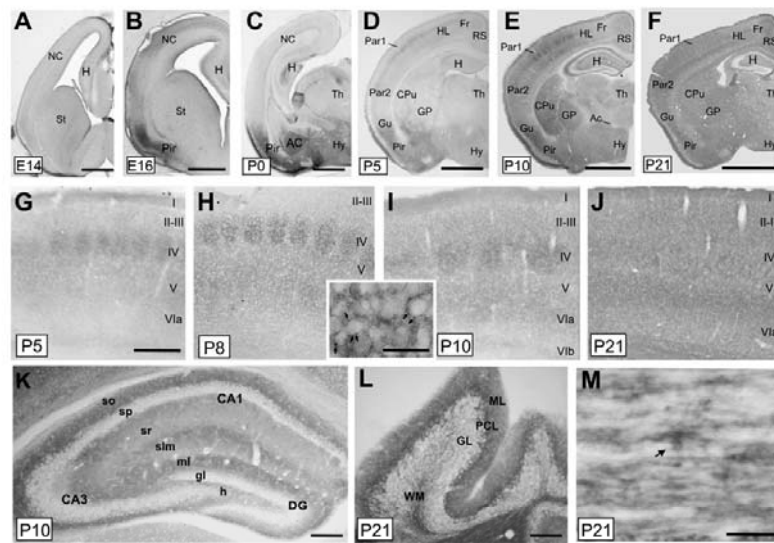


Figure 3. Pattern of OMgp-protein expression during telencephalic development. (A–F) General views of mouse brains at different stages during development: embryonic stage 14 (E14), E16, P0, P5, P10, and P21. (G–J) High magnifications of the primary somatosensory cortex of mice aged from P5 to P21. Notice the relevant staining of the barrel field at layer IV between P5 and P10. A high magnification of an OMgp immunopositive barrel at P7 is shown in the insert. (K) High-power photomicrograph illustrating OMgp staining in P10 hippocampus. (L) OMgp staining in the cerebellum at P21. Purkinje cells are strongly labeled. (M) Transversal section of adult spinal cord labeled with anti-OMgp. An oligodendrocyte-like cell is OMgp positive (arrow) as well as other longitudinal thin processes. Abbreviations as in Figure 1 including AC, amygdaloid complex; HL, hindlimb; H, hippocampus; NC, neocortex and I–Vb, cortical layers; gl, granular cell layer; h, hilus; ml, molecular layer; slm, stratum lacunosum-moleculare; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; GL, granular layer; ML, molecular layer; PCL, Purkinje cell layer; and WM, white matter. Scale bars: (A–F) 500 μ m; (G–K) 200 μ m; (L) 100 μ m, and (M) 10 μ m.

in layers II–III were seen over the intense neuropil, which expands to layer I and lower layers of the pyriform/entorhinal cortex. In addition, pale neuropil staining was seen in the “stratum lacunosum-moleculare” of the developing hippocampus at these stages. At P0, strong immunoreactivity was also observed in the amygdaloid complex and several hypothalamic nuclei (Fig. 3C,D). At P5, puncta-like immunocytochemical staining was observed in all neocortical areas with higher levels in lateral than medial cortical regions. Particularly, pale OMgp staining was observed in all cortical layers in contrast to layer IV where, in the parietal cortex, immunostaining elements were grouped in clusters corresponding to barrels while septa were clearly defined (Fig. 3D,G). In addition, Purkinje cells and axonal tracts of the cerebellum were also stained at P5 (data not shown). At P8–P10, the barrel field was clearly identifiable, and increasing OMgp labeling was observed in subgranular cortical layers in the parietal cortex as well as in the formerly less immunoreactive regions of the cortex, striatum, and dorsal thalamic nuclei (Fig. 3E,H,I). From P15 onward, the labeling of the cortical barrel field was diluted with the intense OMgp immunoreactivity in the telencephalon (Fig. 3F,J). Particularly in the hippocampus, at P5 but especially at P8–P10, the stratum lacunosum-moleculare and the molecular layer of the dentate gyrus and the “stratum oriens” displayed strong OMgp immunoreactivity (Fig. 3E,K). From P15 to P21, the staining of the stratum lacunosum-moleculare gradually decreased to an intensity that was similar to that in the “stratum radiatum” but lower than in the stratum oriens. In the cerebellum, as indicated above, Purkinje cells were stained from P5 onward (Fig. 3L).

OMgp Expression by Adult Hippocampal Interneurons of the CA1 Region

Habib et al. (1998) reported OMgp in local and projection neurons. In addition, in the Allen Brain Atlas, OMgp mRNA is expressed in neurons throughout the CNS. These data were also confirmed by Hunt, Coffin, and Anderson (2002) and recently by Koyama et al. (2008). In previous studies, we analyzed the developmental expression of myelin-associated proteins and receptors in the entorhino-hippocampal system in mouse, rat, and human (Mingorance, Fontana et al. 2004; Mingorance et al. 2005; Gil et al. 2006; Llorens et al. 2008). Thus, to analyze the pattern of labeling of OMgp in the adult hippocampus, we processed horizontal and coronal sections of the adult hippocampal formation (Fig. 4). We found that OMgp was expressed by numerous interneurons mainly in the CA1 region (Fig. 4A). OMgp staining in hippocampal neurons delineated the complete neuron including dendrite and axon. Cell labeling was intense, and several neuronal morphologies, ranking from multipolar to bipolar shapes, were observed scattered in plexiform layers (Fig. 4A,B). Double immunohistochemical labeling of OMgp and markers of local circuit neurons illustrated OMgp immunoreactivity in nonpyramidal cells expressing calcium-binding proteins (Parvalbumin, Calretinin, and Calbindin positive) (see Fig. 4C–E for examples of double-labeled Parvalbumin-OMgp interneurons) as well as some neuropeptides (CCK or SOM) (Fig. 4F–K). Although we were unable to establish a clear and specific colocalization of OMgp with particular subsets of hippocampal interneurons, the first appearance of OMgp staining in hippocampal interneurons coincided with the first

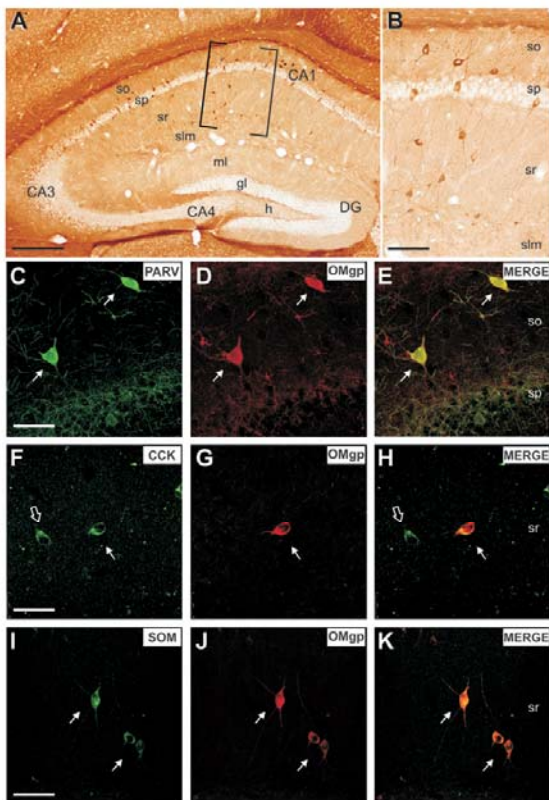


Figure 4. OMgp expression in the adult hippocampus. (A): Low-power photomicrograph of OMgp labeling in the hippocampus. (B): High magnification of the boxed area in (A), OMgp-positive cells in the CA1 region corresponded to hippocampal local circuit neurons. (C-E) Confocal microphotographs illustrating double-labeled (PARV/OMgp) interneurons in the stratum oriens (arrows in C-E); (CCK/OMgp) interneurons in the stratum radiatum (arrows in F-H). Note that some CCK-positive cells are not labeled with OMgp antibody (open arrow in F,H). (I-K) Confocal microphotographs illustrating double-labeled (SOM/OMgp) interneurons in the stratum radiatum (arrows in I-K). Abbreviations as in Figure 3. Scale bars: (A) 200 μ m, (B) 100 μ m, and (C-K) 25 μ m.

appearance of inhibitory potentials in the hippocampus (see Discussion).

OMgp Colocalizes with Presynaptic Axonal Markers in vitro and with Presynaptic Proteins in Synaptosomal Fractions In Vivo

As indicated, OMgp is present during perinatal development in neocortical layer IV in puncta-like staining as well as in developmental axonal tracts. Thus, we next examined the putative presence of OMgp at the synapse (Fig. 5). First, OMgp localization was studied in primary hippocampal cultures after 7 days in vitro (Fig. 5A-H). In cultured neurons, OMgp completely labeled MAP2-positive hippocampal neurons (Fig. 5A-C) but was also present in axonal-like varicosities close to neurites or the perikaryon of other cultured neurons. Further, double immunohistochemical studies showed that OMgp colocalized in axonal varicosities with presynaptic proteins such as Synapsin (Fig. 5D-H). To further confirm that OMgp was present in the presynaptic terminals, we analyzed the distribution of well-

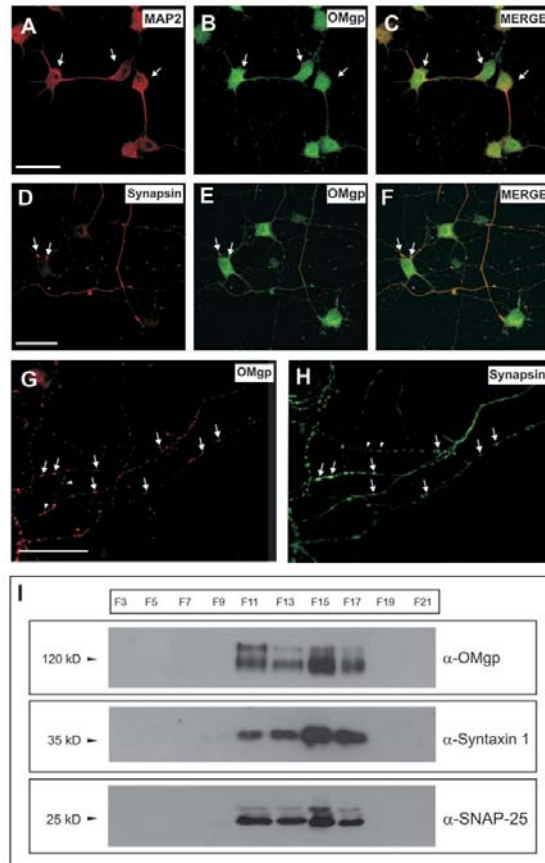


Figure 5. OMgp expression in cultured MAP2-positive hippocampal neurons and Synapsin-labeled presynaptic terminals in vitro. (A-C) Confocal microphotographs illustrating hippocampal cultures (7DIV) incubated with antibodies α -OMgp and α -MAP2 to demonstrate the expression of OMgp in MAP2-positive neurons (arrows). (D-F) Parallel cultures were incubated with antibodies α -OMgp and α -Synapsin to demonstrate the presence of OMgp in axon terminals close to neuronal perikaryons (Synapsin positive, arrows). (G,H) OMgp expression in Synapsin-positive (arrows) axonal varicosities in cultured hippocampal neurons. Note that few OMgp-positive varicosities (arrowheads) are Synapsin negative. (I) OMgp expression in adult forebrain fractionated synaptosomes. Note that OMgp is detected in the same fractions (membrane/vesicles) that are immunoreactive for Syntaxin 1 and SNAP-25. Scale bars: (A,D,G) 25 μ m pertains to (B,E), (C,F), and (H), respectively.

known presynaptic markers (Syntaxin 1 and SNAP-25) in adult sucrose-fractionated brain synaptosomes, and we compared their distribution with OMgp by Western blotting. Fractionation of synaptosomal preparation showed that OMgp was present in the membrane and vesicular fractions (F11-F17), sharing distribution with synaptic markers but not with the cytosolic or mitochondrial fractions (F3-F9 and F19) (Fig. 5I). Taken together, the data suggest that OMgp is localized in axons and synaptosomes in developing and adult neurons.

Altered Thalamo-Cortical Targeting and Barrel-Field Development in omgp^{-/-} mice

As indicated, OMgp is present in developing axonal tracts. To further determine the role of OMgp in the development of the

cortical barrel field, we analyzed the distribution of 5-HTT (serotonin transporter) immunoreactivity in coronal brain sections from 5 *omgp*^{-/-} and 6 wild-type mice at P7 (Fig. 6). The experiments were conducted blind, with no knowledge of the genotype of the brain being processed, and all free-floating sections were bulk processed during the immunolabeling. After the experiment and data acquisition, the genotype of each mouse was determined by immunoblotting (Fig. 6A). First, as indicated, the *omgp* gene is located within intron 27b of the mouse *NF1* gene, which encodes to Neurofibromin (Mikol, Alexakos et al. 1990). NF1-deficient mice display deficits in development of the somatosensory barrel field (Lush et al. 2008). Thus, we aimed to determine whether the pattern of

NF1 expression is altered in *omgp*^{-/-} mice compared with wild-type mice at the postnatal stages of barrel-field formation. After immunostaining, *omgp*^{-/-} and wild-type mice showed similar patterns of immunostaining in the neocortex (Fig. 6B,C) and hippocampus (Supplementary Fig. 1). In addition, cortical layering was maintained in adult *omgp*^{-/-} mice compared with wild type (Supplementary Fig. 2). Next, we determined that the thalamo-cortical connection is formed in *omgp*^{-/-} mice. However, our results revealed that the distribution of the 5-HTT immunostaining in the barrel field showed clear differences in *omgp*^{-/-} compared with controls in the neocortex. In *omgp*^{-/-} mice, barrels were less defined in the first parietal cortex with numerous 5-HTT-positive axons invading

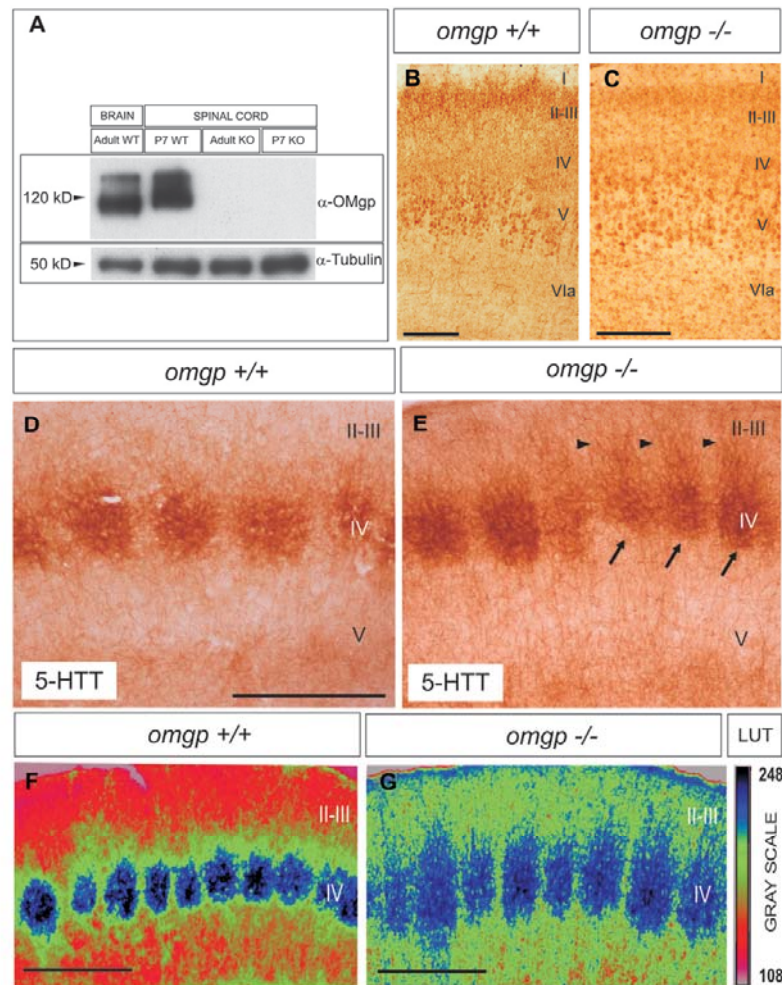


Figure 6. OMgp immunostaining in the primary somatosensory cortex in *omgp*^{-/-} mice. (A) Western blot corroboration of the presence of the OMgp protein in *omgp*^{-/-} mice and wild-type controls. (B,C) Low-power photomicrographs illustrating representative sections of the parietal cortex of a wild-type (B) and *omgp*^{-/-} (C) mouse, immunostained using the α -NF1 antibody. (D-G) Low-power photomicrographs illustrating representative sections of the somatosensory barrel field in control (D,F) and *omgp*^{-/-} (E,G) mice. Barrels in mutant mice (arrows in E) appeared less defined than in controls and numerous 5-HTT-positive axons were seen ectopically in layers II-III (arrowheads). After application of the pseudocolor correlation, the disorganization of the terminal thalamo-cortical field in the somatosensory cortex is better demonstrated. In the right, the LUT pseudocolor scale (Rainbow RGB) from the Image-J program indicating the gray scale value is shown. Abbreviations as in Figure 3. Scale bars: (B,D), 100 μ m pertains to (C,E), respectively. (F,G) 100 μ m.

ectopically layers II–III (Fig. 6E). All the processed mutant mice showed these alterations. In Figure 6, we show the densitometric analysis in one of the analyzed mice and its parallel control littermate (Fig. 6F,G). In conclusion, *omgp*^{-/-} mice showed altered distribution of thalamo-cortical axons in cortical layer IV, which indicates that OMgp is required to restrict correct thalamo-cortical axon targeting in the developing cortical barrel field.

Discussion

Neuronal OMgp Expression during Telencephalic Development

To date, most studies have analyzed the pattern of OMgp expression during postnatal development (Habib et al. 1998; Vourc'h et al. 2003) or in adult stages (Hunt, Coffin and Anderson 2002; Funahashi et al. 2008; Lee et al. 2009). Some studies reported that OMgp is expressed by oligodendrocytes (Funahashi et al. 2008), whereas others indicate a neuronal expression (Habib et al. 1998; Hunt, Coffin, and Anderson 2002; Koyama et al. 2008; Lee et al. 2009). These discrepancies in OMgp expression are very similar to those observed few years ago with the oligodendroglial and neuronal Nogo A expression (see Mingorance, Fontana et al. 2004 for details). From a technical point of view, most authors used OMgp immunostaining because mRNA localization in oligodendrocytes is difficult and tissue treatments may underestimate the amount of mRNA in neurons (Schwab M, personal communication; see also Huber et al. 2002 for details). However, the available evidence indicates that OMgp is a neuronal protein that is also expressed by oligodendrocytes in healthy (Hunt, Coffin, and Anderson 2002) or damaged CNS (Guo et al. 2007), as well as in cultured oligodendrocytes (Habib et al. 1998). Interestingly, OMgp was found in the nodes of Ranvier, a nonmyelinated axon region (Apostolski et al. 1994; Huang et al. 2005; Nie et al. 2006). Huang et al. (2005) reported that OMgp was not localized in compact myelin, but in oligodendroglial-like cells, whose processes converge to form a ring that completely encircles the nodes.

Our results indicate that the goat α -OMgp antibody recognized endogenous and recombinant OMgp protein specifically. OMgp is present along nonmyelinated axonal tracts during telencephalic development and expressed in cultured MAP2-positive hippocampal neurons and adult hippocampal interneurons in vivo. Taken together, our results reinforce the notion that OMgp is expressed in neurons and oligodendrocytes. However, we did not observe OMgp-positive oligodendrocytes in the telencephalic regions due to the relevant neuropil staining of the sections from the second postnatal week onward. However, in transversal sections of the spinal cord, a similar staining to those presented by Huang and coworkers was observed.

Early Expression of OMgp during Cortical Development. A Role in Axon Target Specification?

We have determined that OMgp expression begins early in embryonic development long before the onset of brain myelination. This suggests that OMgp has additional roles other than the formation of the myelin sheath (Nie et al. 2006) or preventing axon regrowth after injury (Ji et al. 2008). OMgp immunostaining in the developing neocortex follows the target-

ing of the thalamo-cortical projection in layer IV in mice (Rice and Van der Loos 1977; Rebsam et al. 2002, 2005). As described, the early cortical barrel in mice appears as a patch around P4 and septa become noticeable at P6 (Rice and Van der Loos 1977). Intrinsic cortical connections in the developing somatosensory barrel field are detected from the first postnatal week after barrel formation (P8–P10) coinciding with the first appearance of spontaneous inhibitory potentials in middle cortical layers (Luhmann and Prince 1991). In our study, OMgp labeling in layer IV appeared during the first stage of barrel development (P4–P5). This suggests that OMgp plays an early role in the fine tuning of the thalamo-cortical axons in the developing cortex. This was corroborated by analyzing the parietal barrel field in *omgp*^{-/-} mice, which displays ectopic 5-HTT labeling in layers II–III. A disrupted barrel-field pattern was also reported in *nfl*^{-/-} mice (Lush et al. 2008) as well in *trkB*^{-/-} mice or MAOA-trkB double knockout (Vitalis et al. 2002). The *omgp*^{-/-} mice used in the present study showed a normal pattern of NF1 protein compared with wild-type mice. Thus, it is unlikely that NF1 is involved in producing the present results. However, the phenotypes of the NF1 deficient mice and the OMgp knockout are different. As indicated by Lush et al. (2008), NF1 knockout mice showed profound differences in cortical layer IV because patterning of cortical cells into barrels was strongly reduced compared with wild-type mice. In contrast, the OMgp-deficient mice showed no apparent differences in the barrel formation and cortical layering (see Supplementary Fig. 2). The deficits observed in the NF1-deficient mice in the thalamo-cortical connection are stronger than those observed in the *omgp*^{-/-} mice. Due to the particular location of the OMgp gene into the NF1 locus (see above), we cannot rule out an additional effect of the OMgp absence in the NF1 phenotype. However, OMgp expression was not determined in NF1 mice (Prof. Parada L, personal communication).

On the other hand, it has recently been reported that brain-derived neurotrophic factor (BDNF), the high-affinity ligand of TrkB receptor, which plays key roles during cortical development (see, e.g., Alcantara et al. 2006), stimulates the phosphorylation of Ngr1 by Casein kinase II, suppressing Nogo-dependent inhibition of neurite outgrowth in neuroblastoma-derived neural cells (Takei 2009). Thus, the absence of TrkB may have a direct effect on Ngr1-mediated axon inhibition and plasticity. It is not clear, whether OMgp expression is modulated by BDNF through TrkB receptor.

OMgp is located at the neuronal membrane (Habib et al. 1998) and carries the HNK-1 epitope (Mikol, Alexakos, et al. 1990), which is also present in well-characterized neural adhesion molecules such as NCAM, L1 or Tenascin R (see Schachner et al. 1995; Yamamoto et al. 2002; or Vourc'h and Andres 2004; for a review). Although our OMgp antibody does not recognize HNK-1, it has been reported that similar CA1 adult hippocampal interneurons labeled with OMgp are HNK-1-positive. The HNK-1 epitope is involved in synaptic plasticity and neuronal physiology both during development and in adulthood (Schachner et al. 1995; Yamamoto et al. 2002). Thus, a putative function of OMgp in neuronal physiology cannot be ruled out. On the other hand, a putative role of OMgp as an adhesion molecule during axonal development cannot be also discarded out either, even if we take into account the modifications of the distribution of 5-HTT axons in the *omgp*^{-/-} mice. Furthermore, the absence of other neuronal MAIPs during development in vitro leads to increased neurite

length and growth cone motility (Mingorance-Le Meur et al. 2007; Montani, Gerrits, Gehrig, Dimou et al. 2009). Although not considered in the present study, we cannot discard a putative function of OMgp modulating cytoskeleton dynamics and neurite length.

To our knowledge, this is the first description of a putative function of MAIPs in barrel-field formation and together with other studies (Martin et al. 2009) the first step toward understanding the role of OMgp during cortical development. Although Nogo-A has been associated with neurite extension (Mingorance-Le Meur et al. 2007; Montani, Gerrits, Gehrig, Dimou et al. 2009), its putative role in the development of the somatosensory barrel field is unlikely, because cortical layering develops normally in Nogo mutant mice (McGee et al. 2005; Mingorance-Le Meur et al. 2007). In addition, Nogo-A expression levels do not change during the critical period, at least in the mouse visual cortex (P20–P26) (McGee et al. 2005), and other MAIPs, such as MAG, appear in the white matter of the somatosensory cortex at P5 (Mingorance et al. 2005). Indeed, numerous studies indicate that nonmyelin-related mechanisms may limit somatosensory barrel field plasticity because the relevant critical period ends earlier in development (P1–P4), before cortical myelination matures (McGee et al. 2005). Thalamo-cortical axon targeting involves the participation of multiple lamina-specific molecules but relevantly its fine tuning via neural activity (see Yamamoto et al. 2007 for a review). Thalamic axons grow and reach the cortex in the absence of OMgp and in the absence of other MAIPs. Moreover, myelination is absent during early barrel-field formation as indicated above, but a role of OMgp via NgR1 (expressed in layer IV neurons at these stages; Mingorance, Fontana et al. 2004) or other receptors (see below) could take place. NgR1 has recently been implicated in activity-dependent synaptic strength (Lcc et al. 2008). In addition, NgR1-mediated signaling from myelin-derived proteins consolidates the neural circuitry established during experience-dependent plasticity (McGee et al. 2005). Furthermore, a recent study described a new MAIPs receptor: PirB (Atwal et al. 2008; Filbin 2008), which has been implicated in restricting cortical plasticity in the visual cortex (Syken et al. 2006). In this scenario, we cannot rule out the participation of OMgp together with other factors in restricting cortical plasticity.

Does OMgp Play a Role at the Synapse?

As indicated, emerging descriptions indicate several roles for myelin protein ligands and receptors in functions very different from those reported above (e.g., see Wang et al. 2006; Mingorance-Le Meur et al. 2007; Pernet et al. 2008; or Montani, Gerrits, Gehrig, Kempf et al. 2009). Nogo-A has been located at the neuronal synapse at the ultrastructural level in the post-synaptic active zone (Liu et al. 2003) as well as in developing axonal tracts (Tozaki et al. 2002; Mingorance Le Meur et al. 2007). Here, we demonstrated, using biochemical and immunocytochemical methods, that OMgp is located in axonal tracts as well as in synaptosomal fractions and in axonal varicosities. Taken together, these data open up the field for a putative role of OMgp at the synapse. Whether these functions are structural or associated with neurotransmission warrants further study. Unfortunately, our antibody does not react with OMgp in postembedding protocols, so we cannot clearly define its location at the synaptic contact, as reported for Nogo-A (Liu

et al. 2003). However, its location in puncta-like structures or synaptosomal fractions points to putative neuronal roles at the synapse, which would increase the new unexpected OMgp functions. For example, recent studies reported new functions for OMgp in controlling stem-cell physiology (Martin et al. 2009). Whether NgR1 or the recently discovered MAIPs receptor PirB or other unknown receptors mediate or participate in these new functions, including the targeting of thalamo-cortical axons, needs to be determined. In this respect, Lee et al. (2008) indicates that NgR1 modulates synaptic transmission by regulating fibroblast growth factor-fibroblast growth factor receptor-mediated signaling. It would be of interest to study whether OMgp–NgR1 or PirB interactions regulate FGF₂ roles in the developing telencephalon. In addition, several HNK-1-binding molecules located in perineural nets have been described, such as laminin, selectins, brevican, or aggrecan, which also contribute to corticogenesis (Hall et al. 1993; Ncedham and Schnaar 1993; Miura et al. 2001; Domowicz et al. 2003). Interestingly, one of the most relevant compounds of the perineural nets is aggrecan, which also showed profound alterations in expression and distributions after sensory deprivation (McRae et al. 2007). Further studies will help to answer these challenging questions.

Supplementary Material

Supplementary material can be found at: <http://www.cercor.oxfordjournals.org/>

Funding

MICINN, Instituto Carlos III, and EU-FP7 PRIORITY (to J.A.D.R. and SAF2005-00171 to E.S.); Generalitat of Catalunya (grants SGR2009-366 to J.A.D.R. and SGR2009-1017 to E.S.); MICINN (MP4-CT-2006-031971 [EU] and TEC2007-60436 to E.C.T.); United States NIH/NINDS (Grant R01NS054734 to B.Z.); NRSA postdoctoral fellowship (to J.K.L.); Juan de la Cierva Program of the MICINN (to F.L.L.); ISCIII (to A.B.); MEC (to V.G. and O.S.); and Generalitat of Catalunya (to R.M.).

Notes

The authors thank R. Rycroft for linguistic advice and I. Jiménez for technical assistance. The authors also thank Prof Christian Andres and Prof Patrick Vourc'h (Université François-Rabelais, France), Prof Melitta Schachner (University of Hamburg, Germany), and Javier Saez-Valero (Instituto de Neurociencias de Alicante, Spain) for reagents. *Conflict of Interest:* None declared.

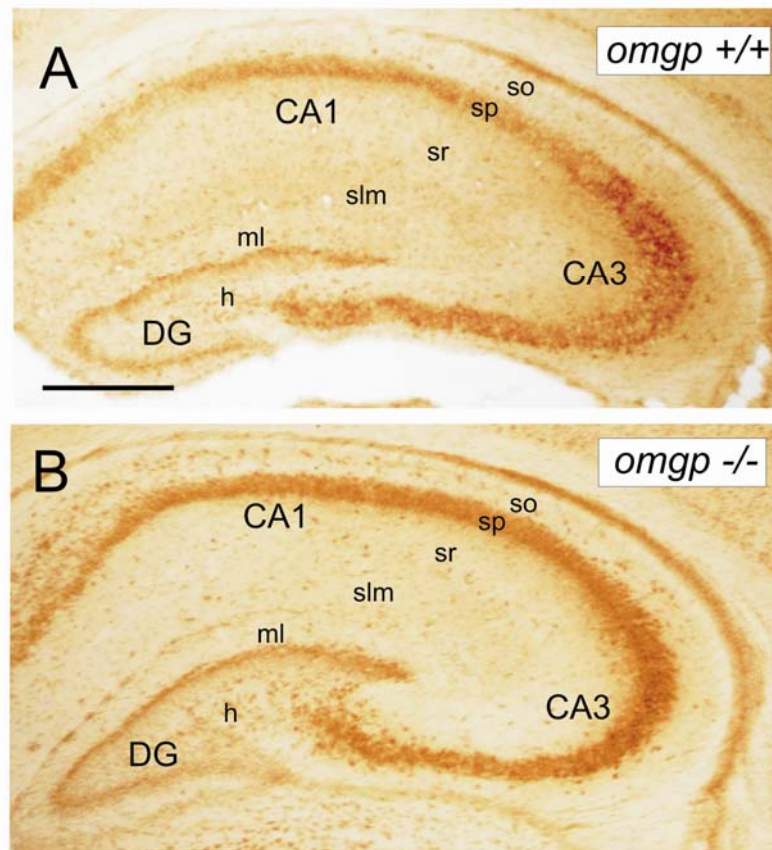
Address correspondence to J.A. del Río, Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, University of Barcelona, Baldiri Reixac 15-21, E-08028 Barcelona, Spain. Email: jadelrio@ibec.pcb.upb.es

References

- Alcantara S, Pozas E, Ibanez CF, Soriano E. 2006. BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization. *Cereb Cortex*. 16:487–499.
- Apostolski S, Sadiq SA, Hays A, Corbo M, Suturkova-Milosevic L, Chaliff P, Stefansson K, LeBaron RG, Ruoslahti E, Hays AP, et al. 1994. Identification of Gal(beta 1-3)GalNAc bearing glycoproteins at the nodes of Ranvier in peripheral nerve. *J Neurosci Res*. 38:134–141.
- Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M. 2008. PirB is a functional receptor for myelin

- inhibitors of axonal regeneration. *Science* (New York, NY). 322:967-970.
- Barton WA, Liu BP, Tzvetkova D, Jeffrey PD, Fournier AE, Sah D, Cate R, Strittmatter SM, Nikolov DB. 2003. Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *EMBO J*. 22:3291-3302.
- Carim-Todd L, Escarceller M, Estivill X, Sumoy L. 2003. LRRN6A/LERN1 (leucine-rich repeat neuronal protein 1), a novel gene with enriched expression in limbic system and neocortex. *Eur J Neurosci*. 18:3167-3182.
- Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, et al. 2002. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*. 35:283-290.
- Domeniconi M, Filbin MT. 2005. Overcoming inhibitors in myelin to promote axonal regeneration. *J Neurol Sci*. 233:43-47.
- Domowicz MS, Mueller MM, Novak TE, Schwartz LE, Schwartz NB. 2003. Developmental expression of the HNK-1 carbohydrate epitope on aggrecan during chondrogenesis. *Dev Dyn*. 226:42-50.
- Filbin MT. 2008. PirB, a second receptor for the myelin inhibitors of axonal regeneration Nogo66, MAG, and OMgp: implications for regeneration in vivo. *Neuron*. 60:740-742.
- Fournier AE, Gould GC, Liu BP, Strittmatter SM. 2002. Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci*. 22:8876-8883.
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. 2001. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*. 409:341-346.
- Fujitani M, Kawai H, Proia RL, Kashiwagi A, Yasuda H, Yamashita T. 2005. Binding of soluble myelin-associated glycoprotein to specific gangliosides induces the association of p75NTR to lipid rafts and signal transduction. *J Neurochem*. 94:15-21.
- Funahashi S, Hasegawa T, Nagano A, Sato K. 2008. Differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo receptors and their ligands in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 506:141-160.
- Gil V, Nicolas O, Mingorance A, Urena JM, Tang BL, Hirata T, Saez-Valero J, Ferrer J, Soriano E, del Rio JA. 2006. Nogo-A expression in the human hippocampus in normal aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 65:433-444.
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. 2000. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature*. 403:439-444.
- Guo Q, Li S, Su B. 2007. Expression of oligodendrocyte myelin glycoprotein and its receptor NgR after the injury of rat central nervous system. *Neurosci Lett*. 422:103-108.
- Habib AA, Marton LS, Alwardt B, Gulcher JR, Mikol DD, Hognason T, Chattopadhyay N, Stefansson K. 1998. Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system. *J Neurochem*. 70:1704-1711.
- Hall H, Liu L, Schachner M, Schmitz B. 1993. The L2/HNK-1 carbohydrate mediates adhesion of neural cells to laminin. *Eur J Neurosci*. 5:34-42.
- Hancock MB. 1986. Two-color immunoperoxidase staining: visualization of anatomic relationships between immunoreactive neural elements. *Am J Anat*. 175:343-352.
- Hu WH, Hausmann ON, Yan MS, Walters WM, Wong PK, Bethea JR. 2002. Identification and characterization of a novel Nogo-interacting mitochondrial protein (NIMP). *J Neurochem*. 81:36-45.
- Huang JK, Phillips GR, Roth AD, Pedraza L, Shan W, Belkaid W, Mi S, Fex-Svenningsen A, Florens L, Yates JR, 3rd, Colman DR, et al. 2005. Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth. *Science* (New York). 310:1813-1817.
- Huber AB, Schwab ME. 2000. Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem*. 381:407-419.
- Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, Oertle T, Schwab ME. 2002. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci*. 22:3553-3567.
- Hunt D, Coffin RS, Anderson PN. 2002. The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review. *J Neurocytol*. 31:93-120.
- Ji B, Case IC, Liu K, Shao Z, Lee X, Yang Z, Wang J, Tian T, Shulga-Morskaya S, et al. 2008. Assessment of functional recovery and axonal sprouting in oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) null mice after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci*. 39:258-267.
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Dimou I, Lin S, Fergani A, Ruegg MA, Schwab ME, Dupuis L, Loeffler JP. 2006. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep*. 7:1162-1167.
- Karnezis T, Mandemakers W, McQualter JL, Zheng B, Ho PP, Jordan KA, Murray BM, Barres B, Tessier-Lavigne M, Bernard CC. 2004. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Neurosci*. 7:736-744.
- Kottis V, Thibault P, Mikol D, Xiao ZC, Zhang R, Dergham P, Braun PE. 2002. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurochem*. 82:1566-1569.
- Koyama Y, Fujiwara T, Kubo T, Tomita K, Yano K, Hosokawa K, Tohyama M. 2008. Reduction of oligodendrocyte myelin glycoprotein expression following facial nerve transection. *J Chem Neuroanat*. 36:209-215.
- Lauren J, Airaksinen MS, Saarna M, Timmusk T. 2003. Two novel mammalian Nogo receptor homologs differentially expressed in the central and peripheral nervous systems. *Mol Cell Neurosci*. 24:581-594.
- Lee H, Raiker SJ, Venkatesh K, Geary R, Robak LA, Zhang Y, Yeh HH, Shrager P, Giger RJ. 2008. Synaptic function for the Nogo-66 receptor NgR1: regulation of dendritic spine morphology and activity-dependent synaptic strength. *J Neurosci*. 28:2753-2765.
- Lee JK, Case LC, Chan AF, Zhu Y, Tessier-Lavigne M, Zheng B. 2009. Generation of an OMgp allelic series in mice. *Genesis*. 00:1-6.
- Liu YY, Jin WL, Liu HL, Ju G. 2003. Electron microscopic localization of Nogo-A at the postsynaptic active zone of the rat. *Neurosci Lett*. 346:153-156.
- Llorens F, Gil V, Iraola S, Carim-Todd L, Marti E, Estivill X, Soriano E, Del Rio JA, Sumoy L. 2008. Developmental analysis of Lingo-1/Lern1 protein expression in the mouse brain: interaction of its intracellular domain with Myt1L. *Dev Neurobiol*. 68:521-541.
- Luhmann HJ, Prince DA. 1991. Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol*. 65:247-263.
- Lush ME, Li Y, Kwon CH, Chen J, Parada LF. 2008. Neurofibromin is required for barrel formation in the mouse somatosensory cortex. *J Neurosci*. 28:1580-1587.
- Martin I, Andres CR, Vedrine S, Tabagh R, Michelle C, Jourdan ML, Heuze-Vourc'h N, Corcia P, Duittoz A, Vourc'h P. 2009. Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells. *Brain Res*. 11:22-30.
- McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW, Strittmatter SM. 2005. Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science* (New York, NY). 309:2222-2226.
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE. 1994. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*. 13:805-811.
- McRae PA, Rocco MM, Kelly G, Brumberg JC, Matthews RT. 2007. Sensory deprivation alters aggrecan and perineuronal net expression in the mouse barrel cortex. *J Neurosci*. 27:5405-5413.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, et al. 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*. 7:221-228.
- Mikol DD, Alexakos MJ, Bayley CA, Lemons RS, Le Beau MM, Stefansson K. 1990. Structure and chromosomal localization of the gene for the oligodendrocyte-myelin glycoprotein. *J Cell Biol*. 111:2673-2679.
- Mikol DD, Gulcher JR, Stefansson K. 1990. The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. *J Cell Biol*. 110:471-479.
- Mingorance A, Fontana X, Sole M, Burgaya F, Urena JM, Teng FY, Tang BL, Hunt D, Anderson PN, Bethea JR, et al. 2004. Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Mol Cell Neurosci*. 26:34-49.

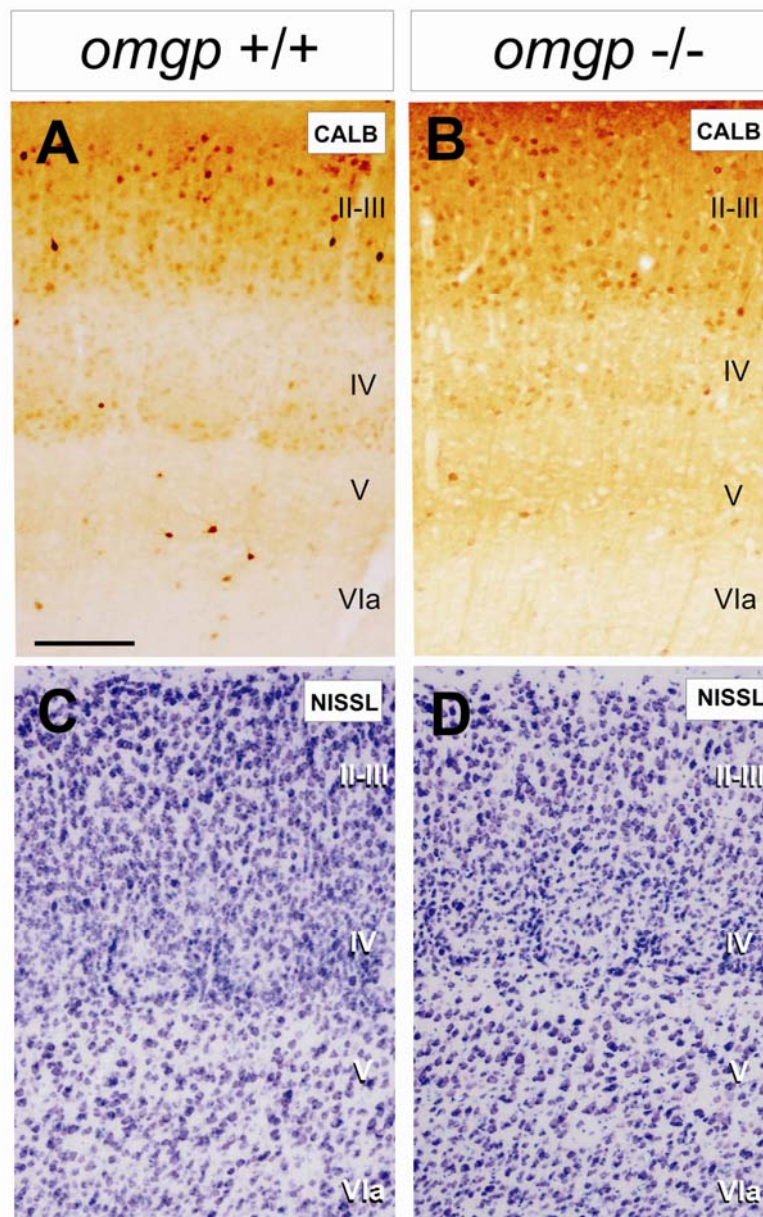
- Mingorance A, Fontana X, Soriano E, Del Rio JA. 2005. Overexpression of myelin-associated glycoprotein after axotomy of the perforant pathway. *Mol Cell Neurosci*. 29:471-483.
- Mingorance A, Soriano-García E, del Rio JA. 2004. [Nogo-A functions during the development of the central nervous system and in the adult]. *Rev Neurol*. 39:440-446.
- Mingorance-Le Meur A, Zheng B, Soriano E, del Rio JA. 2007. Involvement of the myelin-associated inhibitor Nogo-A in early cortical development and neuronal maturation. *Cereb Cortex*. 17:2375-2386.
- Miura R, Ethell IM, Yamaguchi Y. 2001. Carbohydrate-protein interactions between HNK-1-reactive sulfoglucuronyl glycolipids and the proteoglycan lectin domain mediate neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *J Neurochem*. 76:413-424.
- Montani L, Gerrits B, Gehrig P, Kempf A, Dimou L, Wollscheid B, Schwab ME. 2009. Neuronal Nogo-A modulates growth cone motility via Rho-GTP/LIMK1/cofilin in the unlesioned adult nervous system. *J Biol Chem*. 284:10793-10807.
- Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT. 1994. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron*. 13:757-767.
- Needham LK, Schnaar RL. 1993. The HNK-1 reactive sulfoglucuronyl glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin but not E-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:1359-1363.
- Nie DY, Ma QH, Law JW, Chia CP, Dhingra NK, Shimoda Y, Yang WL, Gong N, Chen QW, Xu G, et al. 2006. Oligodendrocytes regulate formation of nodes of Ranvier via the recognition molecule OMgp. *Neuron Glia Biol*. 2:151-164.
- Norton WT, Poduslo SE. 1973. Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem*. 21:749-757.
- Okamoto H, Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Kuma H, Wang ZY, Gu H, Li HP, Matsumoto Y, Irawan S, et al. 2006. Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) in rat hippocampus is depleted by chronic ethanol consumption. *Neurosci Lett*. 406:76-80.
- Park JH, Gimbel DA, GrandPre T, Lee JK, Kim JE, Li W, Lee DH, Strittmatter SM. 2006. Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *J Neurosci*. 26:1386-1395.
- Pernet V, Joly S, Christ F, Dimou L, Schwab ME. 2008. Nogo-a and myelin-associated glycoprotein differently regulate oligodendrocyte maturation and myelin formation. *J Neurosci*. 28:7435-7444.
- Pignot V, Hein AE, Barske C, Wiessner C, Walmsley AR, Kaupmann K, Mayeur H, Sommer B, Mir AK, Frenzel S. 2003. Characterization of two novel proteins, NgRH1 and NgRH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *J Neurochem*. 85:717-728.
- Prinjha R, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, Michalovich D, Simmons DL, Walsh FS. 2000. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature*. 403:383-384.
- Rebsam A, Seif I, Gaspar P. 2002. Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice. *J Neurosci*. 22:8541-8552.
- Rebsam A, Seif I, Gaspar P. 2005. Dissociating barrel development and lesion-induced plasticity in the mouse somatosensory cortex. *J Neurosci*. 25:706-710.
- Rice FL, Van der Loos H. 1977. Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse. *J Comp Neurol*. 171:545-560.
- Schachner M, Martini R, Hall H, Orberger G. 1995. Functions of the L2/HNK-1 carbohydrate in the nervous system. *Prog Brain Res*. 105:183-188.
- Shao Z, Browning JL, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, Thill G, Levesque M, Sah D, McCoy JM, et al. 2005. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron*. 45:353-359.
- Syken J, Grandpre T, Kanold PO, Shatz CJ. 2006. PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science (New York, NY)*. 313:1795-1800.
- Takei Y. 2009. Phosphorylation of Nogo receptors suppresses Nogo signaling, allowing neurite regeneration. *Sci Signal*. 2:ra14.
- Teng FY, Tang BL. 2005. Why do Nogo/Nogo-66 receptor gene knockouts result in inferior regeneration compared to treatment with neutralizing agents? *J Neurochem*. 94:865-874.
- Tozaki H, Kawasaki T, Takagi Y, Hirata T. 2002. Expression of Nogo protein by growing axons in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 104:111-119.
- Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, Mage R, Rader C, Giger RJ. 2005. The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci*. 25:808-822.
- Vitalis T, Cases O, Gillies K, Hanoum N, Hamon M, Seif I, Gaspar P, Kind P, Price DJ. 2002. Interactions between TrkB signaling and serotonin excess in the developing murine somatosensory cortex: a role in tangential and radial organization of thalamocortical axons. *J Neurosci*. 22:4987-5000.
- Vourch P, Andres C. 2004. Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp): evolution, structure and function. *Brain Res Brain Res Rev*. 45:115-124.
- Vourch P, Dessay S, Mbarek O, Marouillat Vedrine S, Muh JP, Andres C. 2003. The oligodendrocyte-myelin glycoprotein gene is highly expressed during the late stages of myelination in the rat central nervous system. *Brain Res*. 144:159-168.
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z. 2002. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*. 417:941-944.
- Wang YZ, Liu YY, Liu JP, You SW, Ju G. 2006. Nogo-66 receptor at the gap junctions between pituitary cells of the rat. *Neuroreport*. 17:605-609.
- Yamamoto N, Maruyama T, Uesaka N, Hayano Y, Takemoto M, Yamada A. 2007. Molecular mechanisms of thalamocortical axon targeting. *Novartis Foundation symposium*. 288:199-208; discussion 208-111, 276-181.
- Yamamoto S, Oka S, Inoue M, Shimuta M, Manabe T, Takahashi H, Miyamoto M, Asano M, Sakagami J, Sudo K, et al. 2002. Mice deficient in nervous system-specific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. *J Biol Chem*. 277:27227-27231.
- Yamashita T, Tohyama M. 2003. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci*. 6:461-467.
- Zhang Z, Xu X, Zhang Y, Zhou J, Yu Z, He C. 2009. LINGO-1 interacts with WNK1 to regulate nogo-induced inhibition of neurite extension. *J Biol Chem*. 284:15717-15728.
- Zhao XH, Jin WL, Ju G. 2007. An in vitro study on the involvement of LINGO-1 and Rho GTPases in Nogo-A regulated differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Mol Cell Neurosci*. 36:260-269.



Supplementary Figure 1.

NF1 immunostaining in the hippocampus in wild-type and *omgp* ^{-/-} mice.

A-B: Low-power photomicrographs illustrating representative sections of the hippocampus of a wild-type (A) and *omgp* ^{-/-} (B) mouse, immunostained using the α -NF1 antibody at P7. Abbreviations as in Figure 3. Scale bars: A, 200 μ m pertains to B.



Supplementary Figure 2

A-D: General views of parietal cortex of a wild-type (A) and *omgp -/-* (B) mouse, immunostained using the α -CALB antibody. A parallel Nissl stained sections are showed in C-D respectively. Abbreviations as in Figure 6. Scale bars: A, 100 μ m pertains to B-D.

Expresión de Nogo-A en el hipocampo humano durante el envejecimiento normal y en la enfermedad de Alzheimer

Vanessa Gil, Oriol Nicolás, Ana Mingorance, Jesús Mariano Ureña, Bor Lueng Tang, Tatsumi Hirata, Javier Sáez-Valero, Isidro Ferrer, Eduardo Soriano y José Antonio del Río.

Resumen

Las proteínas asociadas a mielina, Nogo-A, MAG y OMgp, están implicadas en la formación y estabilización de las vainas de mielina, pero además, también son responsables de la inhibición de la regeneración axonal tras lesión y de la pérdida de plasticidad en el adulto. Estudios recientes sugieren que la expresión de alguna de estas proteínas en el hipocampo (por ej. Nogo-A) puede ser modulada por actividad sináptica o tras lesiones neurales derivadas de ciertas patologías cerebrales como epilepsia del lóbulo temporal, esclerosis múltiple o esquizofrenia. Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ninguna relación entre dichas proteínas y la enfermedad de Alzheimer (AD), situación patológica en la cual ocurre una gran pérdida celular y una significativa reorganización sináptica en áreas relacionadas con el aprendizaje y la memoria. El presente estudio se centra en el análisis de la expresión de Nogo-A en la formación hipocámpica humana en una situación de envejecimiento normal y en AD. Nuestros resultados indican que Nogo-A se expresa en oligodendrocitos y neuronas durante el envejecimiento normal, así como también en células granulares y fibras musgosas del giro dentado. Sorprendentemente, en AD, Nogo-A es sobreexpresado por neuronas hipocámpicas y aparece asociado a depósitos amiloides en placas seniles. Estos resultados sugieren una posible participación de las proteínas asociadas a mielina, así como de los componentes del complejo receptor, en las respuestas asociadas al envejecimiento y en particular a enfermedades neurodegenerativas como AD. Además, también indican que estas proteínas podrían ser consideradas como nuevas diana terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas.

ORIGINAL ARTICLE

Nogo-A Expression in the Human Hippocampus in Normal Aging and in Alzheimer Disease

Vanessa Gil, Oriol Nicolas, Ana Mingorance, Jesús Mariano Ureña, PhD, Bor Lueng Tang, PhD, Tatsumi Hirata, PhD, Javier Sáez-Valero, PhD, Isidro Ferrer, MD, PhD, Eduardo Soriano, PhD, and José Antonio del Río, PhD

Abstract

Myelin-associated proteins are involved in the formation and stabilization of myelin sheaths. In addition, they prevent axon regeneration and plasticity in the adult brain. Recent evidence suggests that the expression of certain myelin-associated proteins (e.g. Nogo-A) can be regulated by synaptic activity or by over-expression after neural lesions in brain syndromes such as temporal lobe epilepsy. However, no studies on Alzheimer disease (AD) have been reported in which cell loss and significant synaptic reorganization occurs. In the present study, we analyze in detail the expression of Nogo-A in the hippocampal formation in normal human aging and in AD. Our results indicate that Nogo-A is expressed by oligodendrocytes and neurons in the aged hippocampal formation. In addition, both granule cells and mossy fiber connections are also labeled in the old-aged hippocampi. Interestingly, Nogo-A is over-expressed by hippocampal neurons in AD and is associated with β -amyloid deposits in senile plaques. Taken together, our results reinforce the hypothesis that Reticulon proteins such as Nogo-A participate in the neuronal responses stemming from hippocampal formation during senescence, and particularly in AD. These findings also indicate that Reticulon proteins could be considered as new putative drug targets in therapies of neurodegenerative disorders.

Key Words: Alzheimer disease, Human hippocampus, Myelin-associated proteins, Nogo-A.

From Development and Regeneration of the CNS (VG, ON, AM, JMU, ES, JADR), IRB-PCB, Barcelona Science Park, University of Barcelona, Spain; Department of Biochemistry (BLT), National University of Singapore, Republic of Singapore; Division of Brain Function (TH), National Institute of Genetics, Graduate University for Advanced Studies, Japan; Instituto de Neurociencias de Alicante (JSV), Universidad Miguel Hernández-CSIC, Spain; and Institute of Neuropathology (IF), Faculty of Medicine, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, University of Barcelona, Spain.

Grant support provided by the Spanish Ministry of Science and Technology (MCYT; EET2002-05149 and BFI2003-03594) and the Caixa Foundation to JADR; and SAF2004-07929 to ES. ON is a predoctoral fellow of the Ramón Areces Foundation, and VG and AM are predoctoral fellows of the Spanish Ministry of Education and Science.

Send correspondence and reprint requests to: José Antonio del Río, PhD, Development and Regeneration of the CNS, Department of Cell Biology-IRB, Barcelona Science Park, Universitat de Barcelona, Josep Samitier 1-5; E-08028, Barcelona, Spain; E-mail: jario@pcb.ub.es or jrio@ub.edu

Supplementary data is available online at <http://www.jneuropath.com>.

INTRODUCTION

Alzheimer disease (AD) is characterized by the presence of neuritic and cerebrovascular plaques containing β -amyloid (A β) peptides, neurofibrillary tangles enriched in hyperphosphorylated tau protein, activation of glial cells, and neuronal degeneration (1-3). Numerous studies have reported that fibrillar A β peptides are toxic to several cell types, including cultured neurons *in vitro* (4) and *in vivo* (5), endothelial cells (6), and glial cells (7). Oligodendrocytes are particularly reactive and vulnerable to oxidative stress, inflammatory cytokines, and excitotoxic neurotransmitters, all of which cause injury in AD-affected brains (8). Hence, the degeneration of oligodendrocytes may correlate with the loss of myelinated axonal tracts described in AD (9, 10). The loss of oligodendrocytes might have deleterious effects on neuronal viability, since they express multiple growth factors in the normal brain (11-13).

Several myelin-associated proteins involved in the formation and maintenance of myelin sheaths also prevent axonal regeneration and plasticity in the adult mammalian CNS (14). To date, 3 myelin inhibitors with these functions have been characterized: Nogo-A (15-17), myelin-associated glycoprotein (MAG) (18, 19), and oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) (20, 21). Nogo-A contains 200 amino acids in its C-terminal region, which is homologous to members of the Reticulon (*Rtn*) gene family (22). All 3 myelin-derived molecules share a common neuronal receptor complex comprising NgR, p75, TAJ-1/TROY, and LINGO-1 (23-26). Studies using α -Nogo antibodies have shown that most Nogo proteins in oligodendrocytes and neurons are localized to the endoplasmic reticulum, with only a low percentage found in the cell membrane (17, 27-29).

Several studies have described the presence of Nogo-A and NgR mRNAs and proteins in the human brain, both during development (30-32) and in the adulthood (33, 34). However, characterization of Nogo-A-immunoreactive cell types in the adult hippocampus has led to conflicting results (33, 34). Although the function of Nogo-A in neurons is largely unknown, it has been implicated in synaptic plasticity following CNS injuries in rodents (35-39). In addition, recent findings indicate that cell expression of certain myelin-associated proteins can be modified in several brain pathologies. Indeed, increased levels of Nogo-A have been described in patients with temporal lobe epilepsy (34)

and in multiple sclerosis (40). Increased Nogo-A mRNA levels have been reported in schizophrenia (41–43). In spite of these studies, no data are available on AD, in which increased myelin-basic protein (MBP) mRNA levels have been described in affected brains, in parallel with losses of myelin tracts (44, 45). The hippocampal formation (HF) is an early and one of the most severely affected brain areas in AD (1). With this in mind, we examined the expression of Nogo-A in human HF in both normal aging and AD. We provide evidence that Nogo-A is expressed in the adult human hippocampus by principal and local-circuit neurons, as well as by oligodendrocytes. Surprisingly, Nogo-A immunoreactivity is also observed in granule cells and their projecting axons in old-aged brains. Moreover, a relevant increase in Nogo-A expression is found in pyramidal

neurons of both the HF and the neocortex in AD and is also localized in senile plaques around amyloid deposits that were also surrounded by reactive astrocytes. Taken together, these results not only indicate that Nogo-A is upregulated in the AD hippocampus, but also reinforce the hypothesis that Nogo-A plays a role in synaptic plasticity and functional reorganization in certain brain diseases.

MATERIALS AND METHODS

AD and Non-AD Cases

This study is based on 14 non-AD and 16 AD post-mortem human brains from the Institute of Neuropathology and University of Barcelona/Hospital Clinic Brain Banks. All brains were obtained within 2 to 13 hours after death, following

TABLE. AD and Non-AD Cases Examined in the Present Study

Patient ID	Age (y), Sex	Time Postmortem (h)	Cortical region	Post-fixation time (d)	Type of investigation
Non-AD					
nAD ₈₈	51, M	4	HF	1	IHC
nAD ₂₂	52, M	4	HF	15	IHC
nAD ₃₄	53, M	3	HF	1	IHC
nAD ₈₅	55, M	7	HF	1	IHC
nAD ₂₅	65, F	4	HF + FC	1	IHC
nAD ₁₈₃	71, F	2.4	FC	1	IHC
nAD ₆₅	73, F	7	HF	1	IHC
nAD ₁₀₀	80, F	3.30	HF	1	IHC
nAD ₀₅	58, M	4	HF		WB
nAD ₁₈₀	69, F	2.3	HF		WB
nAD ₃₅₂	70, F	5	FC		WB
nAD _{03/3}	71, F	7	FC		WB
nAD _{27/02}	74, M	6.15	FC		WB
nAD _{71/02}	76, F	5	FC		WB
AD					
AD ₆₃	68, M	4.45	IIF + FC	1	IHC
AD ₁₄₉	69, M	4	HF	15	IHC
AD ₁₂₂	75, M	4	HF	15	IHC
AD ₁₅₇	79, M	4.45	HF	1	IHC
AD ₁₄₈	83, F	4	HF	1	IHC
AD ₁₇₃	83, F	5	HF	1	IHC
AD ₁₈	84, F	2	FC	1	IHC
AD ₄₃₃	67, M	7.3	FC		WB
AD ₄₃₈	67, M	2.3	FC		WB
AD ₄₄₀	72, M	7.3	FC		WB
AD ₄₃₀	77, F	6.15	FC		WB
AD ₆₅₇	77, M	6	HF		WB, IP
AD _{41/02}	78, M	7	FC		WB
AD ₇₁₀	80, M	13	HF		WB, IP
AD ₄₂₉	81, F	3.3	FC		WB
AD ₇₁₃	90, M	4.30	HF		WB, IP
Epileptic					
E ₂₄₀	65*, M	-	HF		IHC
E ₂₄₁	43*, F	-	HF		IHC

E, samples from epileptics with sclerotic hippocampi; y, years; *, age at the time of surgery; M, male; F, female; h, hours; HF, hippocampal formation; FC, frontal cortex; d, days; IHC, Immunohistochemistry; WB, Western blot; IP, immunoprecipitation.

the Code of Ethics of the World Medical Association and the protocols of the local ethical committee. Basic patient data are shown in the Table. Clinically, 16 patients had suffered from severe dementia of Alzheimer type following the diagnostic criteria of the NINCDS-ADRDA, and all of them had a clinical dementia rating scale (CDR) stage 3 (46). Fourteen cases were neurologically normal. Cases with and without clinical neurological disease were processed in the same way following the same sampling and staining protocols. At autopsy, half of each brain was fixed in 10% buffered formalin, while the other half was cut in coronal sections 1-cm thick, frozen on dry ice, and stored at -80°C until use. In addition, 2-mm-thick samples of the cerebral isocortex, cingulum, hippocampus and entorhinal cortex, and brainstem were fixed with 4% paraformaldehyde for 24 hours, cryoprotected with 30% sucrose, frozen on dry ice, and stored at -80°C until use. Following neuropathological examination, AD cases were categorized as stages V/VIC of Braak and Braak (1, 47). Concomitant Lewy body disease occurred in no case. Control cases (non-AD) did not show neurological or metabolic disease, and the neuropathological examination, carried out in similar regions and with the same methods as in AD cases, did not show lesions. In particular, no amyloid or tau deposits were seen in the regions examined. Therefore, cases with AD-related changes corresponding to stages I to III of Braak and Braak were not considered in the present study.

In addition, paraformaldehyde-fixed sections of the HF from 2 epileptic patients with hippocampal sclerosis who had undergone an anterior temporal lobectomy at the Neurosurgery Department of the "La Princesa" Hospital (Madrid, Spain) (Table) (see ref. [48] for technical details) were included in this study.

Antibodies

Several antibodies against Nogo proteins were used: a polyclonal antibody against amino acids 223–399 of human Nogo-A (Gen Bank Accession No. KIAA0886, diluted 1:2000); a goat polyclonal antibody against Nogo, N-18, which recognizes Nogo-A, -B, and foonen (diluted 1:200 from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); and a monoclonal antibody (NG1) against Nogo-A (49). The following primary antibodies were also used: a mouse monoclonal antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP, diluted 1:500, Chemicon, Temecula, CA) to label astrocytes; a mouse monoclonal antibody against MBP (Chemicon) to label the myelin protein (diluted 1:500 for Western blot and 1:250 for immunohistochemistry); a monoclonal antibody against a nonapeptide epitope derived from the hemagglutinin protein of human influenza virus (HA, diluted 1:1000, clone 12CA5; Roche Applied Science, Indianapolis, IN); a rabbit polyclonal antibody against human neuronal specific enolase (NSE, diluted 1:200, Dako, Glostrup, Denmark); a monoclonal antibody against human β -amyloid (1–17) (clone 6E10, diluted 1:500, Sigma, St. Louis, MO). Finally, a rabbit polyclonal antibody against carnosine (β -alanyl-L-histidine) (CAR, diluted 1:400; kindly provided by F.L. Margolis, Baltimore, MD) was used to label oligodendrocytes (50, 51).

Western Blotting and Immunoprecipitation Techniques

Human postmortem tissue samples from frontal cortex (area 8) and hippocampal formation (Table) were homogenized (10% w/v) in ice-cold Tris-saline buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.5% (w/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) Nonidet P-40 (Igepal, Sigma) and 1 \times cocktail of protease and phosphatase inhibitors (HB buffer) (52), using a motor-driven glass-TEFLON homogenizer in ice. The homogenate was clarified by centrifugation at $13,000 \times g$ for 15 minutes, and the protein contents of soluble fractions were determined using the Bio-Rad detergent-compatible assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Tissue extracts (i.e. 10 μg for MBP or 30 μg for Nogo-A samples) were boiled in Laemmli sample buffer at 100°C for 10 minutes, followed by 6 to 10% SDS-PAGE, and electro-transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) for 6 hours. Following transfer, membranes were incubated overnight at 4°C with either α -Nogo-A antibody (N-18, 1:200 diluted (53), α -NSE [1:200 diluted], or α -MBP [1:500 diluted]). Membranes were subsequently incubated with peroxidase-tagged secondary antibodies (α -IgG raised in goat, rabbit, or mouse, respectively, Dako) and peroxidase activity was visualized using the ECL-plus kit (Amersham Biosciences). Cell extracts from Nogo-A transfected COS1 cells were used as an internal control. Quantification of the density of bands of Western blots was performed using the Bio-Rad Quantity One Image software (Bio-Rad). Films were scanned at 1,200 x 1,200 dpi resolution and the densitometric values (from 0 to 255) of labeled bands were determined. The ratio of Nogo-A or MBP bands to NSE was then calculated for each AD and non-AD sample. The Student *t*-test was used to assess statistical significance.

For immunoprecipitation, brain lysates from AD patients (Table) were incubated with 1 μg of α -Nogo A or α -A β or pre-immune serum at 4°C overnight. This mixture was subsequently incubated with Protein G beads (Sigma) for 2 to 4 hours at 4°C . The beads were washed 3 times, once in 20 mM Tris buffer, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100, protease and phosphatase inhibitors, and twice in the same buffer containing only 0.1% Triton X-100. The beads were re-suspended in SDS-PAGE loading buffer, boiled, and analyzed by Western blot.

Characterization of α -Nogo-A Antibodies

COS1 cells were maintained in culture with Dulbeccó's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine, and antibiotics (all purchased from GIBCO Life Technologies, Paisley, UK). Cells were grown in 35-mm-diameter 6-well multiplates (Nunc, Roskilde, Denmark) containing 10-mm-diameter glass coverslips at 60 to 70% confluence and transiently transfected with N-terminal HA-tagged human RTN4-A/Nogo-A (pCAGGS-HA-RTN-XS, [54]) or human RTN4-B/Nogo-B (pCMV-ASY/Nogo-B [55]) using Lipofectamine-Plus reagents according to the manufacturer's instructions (GIBCO Life Technologies). Seventy-two hours later, the coverslips were removed from the culture plate and fixed in 1% buffered paraformaldehyde (15 minutes,

4°C), rinsed in PBS 0.1M, pH 7.2–7.5, and stored. The remaining cells were scraped and harvested in Laemmli sample buffer. Cell extracts were separated by 6 to 10% SDS-PAGE electrophoresis, electro-transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted. Parallel coverslips were permeabilized with 0.1 M PBS containing 0.5% Triton X-100 for 15 minutes, blocked with normal goat serum, and sequentially incubated with primary antibodies for 2 hours at 30°C and then for 1 hour with Alexa Fluor-tagged secondary antibodies. After rinsing in PBS, cells were stained with Bisbenzamide (Hoescht 32444, 1 μM in PBS 0.1M, for 10 minutes), rinsed, and mounted in Fluoromount (Vector Labs, Burlingame, CA). In addition, primary antibodies were also checked on Western

blots of brain protein extracts from newborn mice obtained in HB buffer as above.

Immunohistochemical Techniques

Sections (40- to 50-μm-thick) were obtained in a freezing microtome (Leica, Wetzlar, Germany) and processed. For immunohistochemistry, the sections were processed as follows: after rinsing in 0.1 M PBS, endogenous peroxidase activity was inhibited by a solution of 10% methanol and 3% hydrogen peroxide for 25 to 30 minutes. After blocking in a solution containing 10% normal serum for 2 hours, free-floating sections were incubated overnight with primary antibodies at

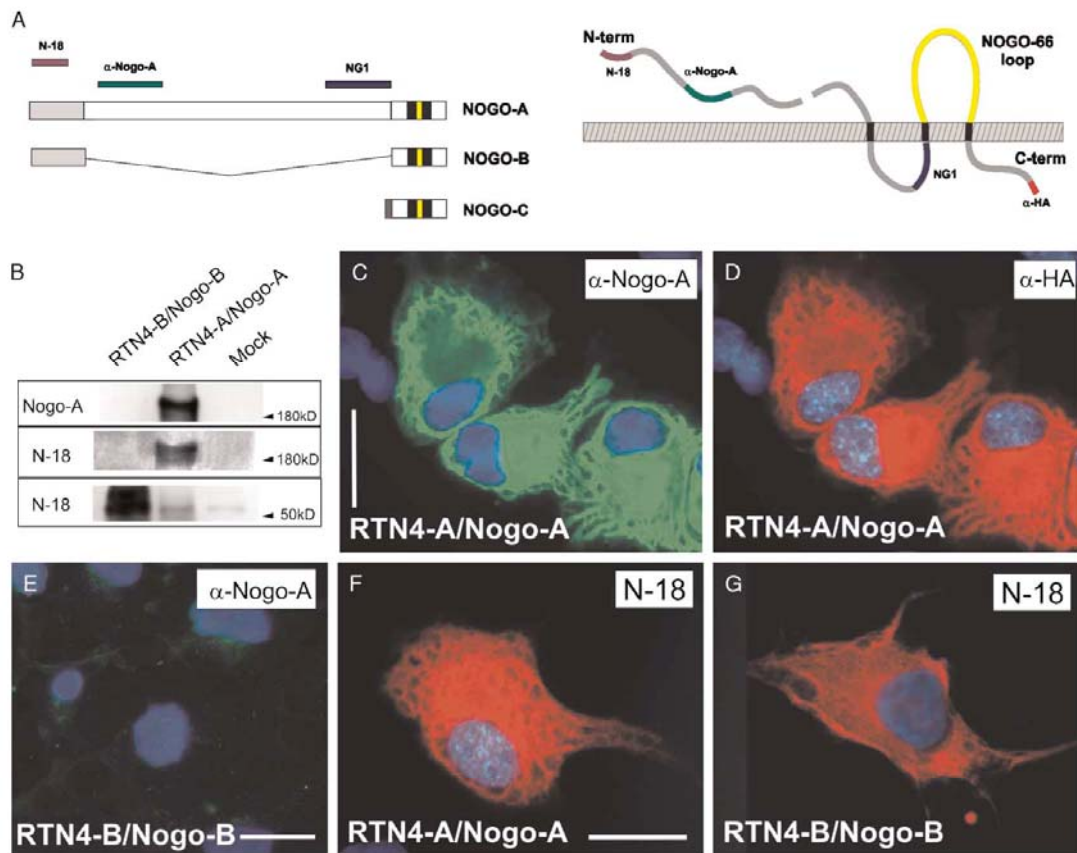


FIGURE 1. Recognition of Nogo-A by the antibodies used in the present study. **(A)** Localization of the Nogo-A regions detected by α-Nogo-A and N-18 antibodies. Note that the N-terminal region of the Nogo-A molecule has been schematized outside the cell, as was recently described by Dood et al (29). **(B)** Immunoblot of Nogo-A using α-Nogo-A and N-18 antibodies in cell extracts of RTN4-A/Nogo-A, RTN4-B/Nogo-B, and Mock-transfected cells. **(C E)** Examples of COS1 cells transfected with RTN4-A/Nogo-A or RTN4-B/Nogo-B and immunostained with α-Nogo-A **(C, E)** and α-HA antibodies **(D)**. A lattice-like network characteristic of the endoplasmic reticulum is co-labeled with both antibodies following RTN4A/Nogo-A but not with RTN4B/Nogo-B. **(F, G)** COS1 transfected with RTN4-A/Nogo-A or RTN4-B/Nogo-B exhibited similar immunostaining with α-pan-Nogo (N-18) antibody. Scale bars = **(C)** 50 μm pertains to **(D)**; **(E)** 50 μm; **(F)** 50 μm pertains to **(G)**.

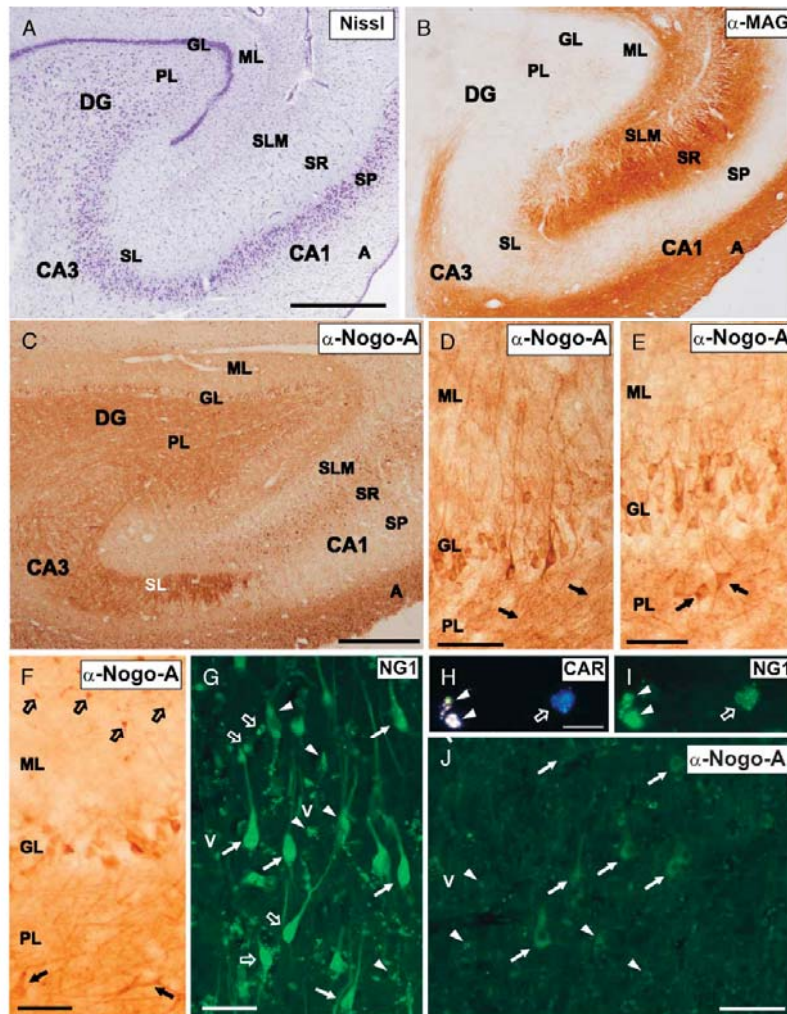


FIGURE 2. Topographical and cellular localization of Nogo-A in adult human hippocampal formation and frontal cortex. **(A, B)** Nissl staining **(A)** and panoramic distribution of MAG **(B)** in the hippocampus of a 73-year-old control patient. **(C)** Low-power photomicrograph of the hippocampus illustrating the distribution of Nogo-A immunoreactivity in the same case. Note the Nogo-A labeling in the granule cell layer of the dentate gyrus in the control hippocampus. **(D, E)** High-magnification photomicrographs illustrating details of Nogo-A immunoreactivity in the dentate gyrus. Granule cell axons **(D)**, arrows) and some immunoreactive neurons displaying multipolar shapes **(E)**, arrow) can be seen in the polymorphic cell layer. **(F)** High-magnification photomicrographs illustrating details of Nogo-A immunoreactivity in the dentate gyrus of a 53-year-old patient. Note the labeling of small cells (open arrows) of the SLM and large multipolar cells (arrows) in the polymorphic layer. In contrast, granule cells exhibit lower Nogo-A immunostaining than in older individuals. **(G)** High-magnification photomicrographs illustrating Nogo-A immunoreactivity in the entorhinal cortex using the NG1 antibody of a 73-year-old patient. Note the intense labeling of pyramidal (arrows) and non-pyramidal neurons (open arrows), and the characteristic autofluorescence of lipid deposits in old human neurons (arrowheads). **(H, I)** High magnification illustrating a double-labeled (CAR/Nogo-A) oligodendrocyte (open arrow) in the entorhinal cortex using AMCA- and Alexa Fluor-tagged secondary antibodies. The autofluorescence lipid deposits (arrowheads) are also labeled. **(J)** Photomicrographs illustrating Nogo-A immunoreactivity in the frontal cortex, using the α -Nogo-A antibody, of a 71-year-old patient. Principal neurons (arrows) and lipid deposits (arrowheads) can be seen. A, alveus; CA1-3, cornu ammonis region 1-3; DG, dentate gyrus; EC, entorhinal cortex; GL, granule layer; ML, molecular layer; PL, polymorphic cell layer; S, subiculum; SL, stratum lucidum; SLM, stratum lacunosum-moleculare; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum. Scale bars = **(A)** 500 μ m pertains to **(B)**; **(C)** 500 μ m; **(D, J)** 50 μ m.

4°C. All primary antibodies were diluted in 0.1M PBS containing 5% normal serum, 0.2% gelatin and 0.5% Triton X-100. Tissue-bound primary antibody was detected utilizing the ABC method (Vector Laboratories). Peroxidase activity was revealed using 0.03% DAB and 0.01% hydrogen peroxide. Afterwards, sections were mounted onto gelatinized slides, dehydrated, and coverslipped with Eukitt (Merck, Darmstadt, Germany).

In sections processed for immunofluorescence, primary antibodies were detected with Alexa-Fluor 488-, Alexa-Fluor 568- (Molecular Probes, Eugene, OR) or AMCA-tagged secondary antibodies (Vector Laboratories). Sections were mounted on Fluoromount and analyzed with a Leica Confocal microscope (TCS SPII, Leica).

Immunocytochemical controls, including omission of the primary antibody or its substitution by normal serum, prevented immunostaining in sections from non-AD and AD brains. For quantitative study, the mean number of Nogo-A-positive pyramidal cells in a 500- μ m segment of the pyramidal layer in the CA2 and CA3 regions of consecutive sections ($n = 3$) of selected non-AD (3 cases) and AD (3 cases) as well as epileptic (2 cases) subjects was counted using a 40x oil immersion objective.

RESULTS

Characterization of α -Nogo-A Primary Antibodies

Immunoblot analysis using both α -Nogo-A and N-18 antibodies (Fig. 1), but not NG1 monoclonal antibody, detected a band of approximately 220 kDa in mouse brain extracts and in lysates of RTN4-A transfected COS1 cells (Fig. 1B). However, only N-18 identified a band of approximately 80 kDa in RTN4-B/Nogo-B transfected COS1 cells and the endogenous Nogo-B expressed in Mock and RTN4-B transfected COS1 cells of monkey kidney origin (Fig. 1B). In addition, COS1 cells transfected with HA-tagged RTN4-A/Nogo-A cDNA revealed an internal membrane staining pattern characteristic of the endoplasmic reticulum using antibodies against Nogo-A and NG1 (Fig. 1C). This labeling strongly matches the distribution pattern of the HA-epitope of the fusion protein revealed by the α -HA antibody (Fig. 1D), thus indicating that the α -Nogo-A antibody recognizes the HA-tagged RTN4-A/Nogo-A protein. Similar results were obtained using the N-18 antibody from Santa Cruz (Fig. 1F) and the monoclonal NG1 (see Fig. 2G for labeling in human tissue). However, diffuse fluorescence labeling by α -Nogo-A or NG1 was observed when COS1 cells were transfected with RTN4-B/Nogo-B (Fig. 1E), in contrast to those labeled by the N-18 antibody (Fig. 1G). Taken together, these results demonstrate that the antibodies against Nogo-A used in the present study exclusively recognize Nogo-A in humans and rodents.

Nogo-A Expression in Normal Aging and in AD Hippocampal Formation

To improve the definition of laminar boundaries, some sections parallel to those used for Nogo-A immunocytochemistry were either immunostained with the α -MAG

antibody or Nissl-stained (Fig. 2A, B). The cell pattern and distribution of Nogo-A immunolabeling in tissue samples of human hippocampi was highly sensitive during postmortem and paraformaldehyde fixation. Postmortem times longer than 6 to 7 hours prior to autopsy, or prolonged paraformaldehyde fixation (more than 4 to 5 days), significantly decreased neuronal Nogo-A staining. For example, in cases AD₁₂₂ and non-AD₂₂ (Table), where paraformaldehyde fixation lasted more than 10 to 15 days, Nogo-A was limited to small cells (oligodendrocytes, see below) in the white matter (Supplementary Fig. 1).

The pattern of Nogo-A immunostaining in the human hippocampal formation of aged cases was similar to that reported in adult rodents (53). Thus, Nogo-A immunoreactivity was prominent in the white matter and fimbria, as well as in neural parenchyma of both the entorhinal cortex and hippocampus, which matched the distribution of myelinated fiber tracts in the hippocampus, as determined by MAG labeling (Fig. 2B). Both principal and non-pyramidal neurons were immunolabeled with α -Nogo-A antibody, as well small-sized cells (8- to 10- μ m-diameter main axis) resembling oligodendrocytes (Fig. 2). This was confirmed by double fluorescence labeling using α -Carnosine (a oligodendrocyte marker (56, 57) and α -Nogo-A antibodies (Fig. 2H, I).

Interestingly, numerous, but not all, granule cells in the dentate gyrus were also immunostained, displaying a Golgi-like pattern with apical dendrites expanding into the molecular layer (Fig. 2C-E). Moreover, mossy fiber projections were particularly immunolabeled (Fig. 2C). A detailed analysis of Nogo-A immunoreactivity in granule cells indicated a moderate increase in older (>65 years) than in middle-aged (50 years) cases (Fig. 2D, E). In addition, a few pyramidal neurons in the hippocampus proper (CA1-3) were slightly immunostained, with increasing numbers in the subiculum and the adjacent entorhinal cortex (Fig. 2G), as well as in the frontal cortex (Fig. 2J). This pattern was obtained equally using either α -Nogo-A or NG1 antibodies. Lastly, Nogo-A-positive non-pyramidal neurons exhibiting multipolar, inverted-pyramidal or more irregular shapes were seen scattered in pyramidal, granule and polymorphic cell layers of the hippocampus, as well as in the entorhinal cortex (Fig. 2E). Taken together, these results corroborate that Nogo-A is expressed in neurons and oligodendrocytes in the human hippocampal formation.

The distribution pattern for Nogo-A-immunoreactive elements in the hippocampal formation in AD was similar to that observed in normal aging with the white matter, granule cells, and mossy fiber projections clearly delineated. Moreover, oligodendrocytes were seen in both the stratum radiatum and stratum lacunosum-moleculare (Fig. 3). However, increased numbers of Nogo-A-positive polymorphic and pyramidal cells, especially in the CA3-2 regions, were seen in the AD hippocampus, in contrast to non-AD samples (30.6 ± 3.1 (AD) vs 5.1 ± 0.5 (non-AD; mean \pm SDM) (Fig. 3B, C, E). This was also observed in the HF of epileptic patients (Fig. 3D, E). Increased Nogo-A expression by commissural/associative cells correlated with the prominent immunoreactivity found in the inner portion of the molecular layer of the dentate gyrus (Fig. 4A). In addition, increased numbers of

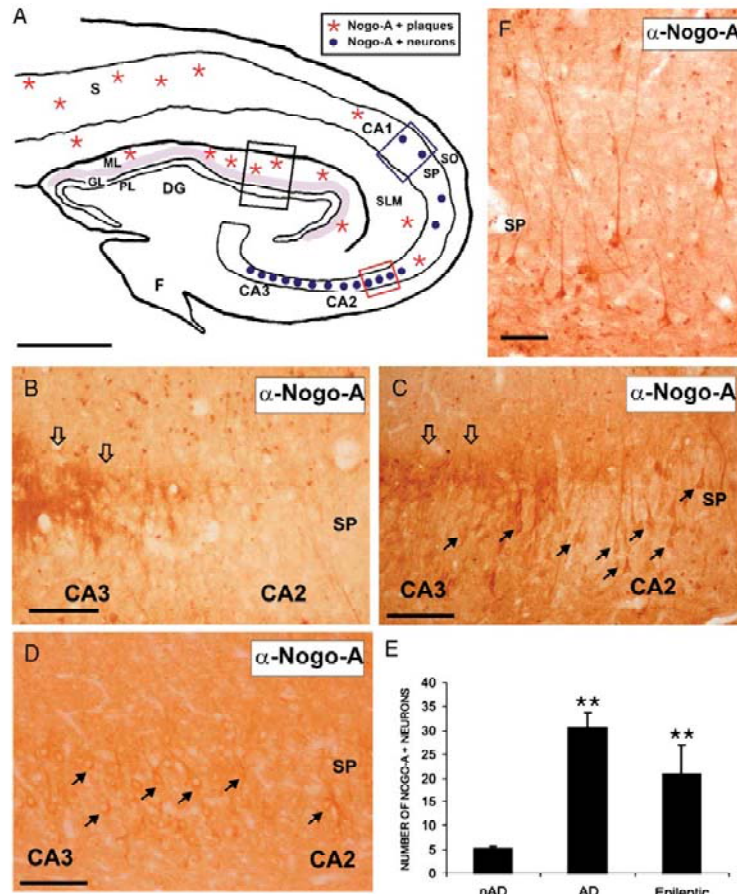


FIGURE 3. Nogo-A immunoreactivity in AD hippocampal formation. **(A)** Camera lucida drawing depicting the principal changes in Nogo-A-positive elements in the AD hippocampus. Blue dots represent Nogo-A-over-expressing pyramidal neurons in the CA3-2 region. Asterisks represent Nogo-A-containing deposits. The increased Nogo-A labeling of the inner molecular layer of the dentate gyrus in AD-affected hippocampi is labeled in violet (see Results for details). **(B, C)** High-magnification photomicrographs of the red-boxed area in **(A)** illustrating details of Nogo-A immunoreactivity in the CA3-2 region in control **(B)** and AD **(C)** cases. Note the increased number of Nogo-A-immunoreactive pyramidal neurons in AD. Open arrows point to the mossy fiber projection in the SL of the CA3. **(D)** High-magnification photomicrograph illustrating details of Nogo-A immunoreactivity in the CA3-2 region in the epileptic hippocampus of a 43-year-old patient. Numerous Nogo-A-positive pyramidal cell (arrows) are labeled. **(E)** Quantification of Nogo-A-labeled cells in the CA2-3 regions of AD, age-matched controls (nAD) and epileptic patients. Quantitative data in histograms are expressed as the mean number of immunoreactive cells. Error bars correspond to the standard deviation of the mean (SDM). Asterisks indicate statistically significant differences between AD/epileptic and nAD (non-AD or age-matched controls) columns (**, $p < 0.05$; Student *t*-test) **(F)** Photomicrograph illustrating examples of Nogo-A-immunoreactive pyramidal cells localized in the blue-boxed region of **(A)**. A, alveus; CA1-3, cornus ammonis region 1-3; DG, dentate gyrus; EC, entorhinal cortex; GL, granule layer; ML, molecular layer; PL, polymorphic cell layer; S, subiculum, SL, stratum lucidum; SLM, stratum lacunosum-moleculare; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum. Scale bars = **(A)** 500 μ m; **(B, D, F)** 75 μ m.

pyramidal cells were also immunolabeled in the CA1 (Fig. 3G) and in the frontal cortex (Figs. 3G, 4C).

Strong Nogo-A immunoreactivity was also localized in neuritic plaques, as revealed with NG1 and α -Nogo-A antibodies in the hippocampus as well as in the entorhinal cortex (Fig. 4A, B, D-F). A quantitative study revealed that

64% of amyloid deposits in the HF were associated with Nogo-A-containing cellular processes. This labeling was not observed in immunocytochemical controls. However, Nogo-A did not co-immunoprecipitate with either A β or APP as determined in parallel experiments, a feature that suggest no physical interaction (Supplementary Fig. 2). Finally,

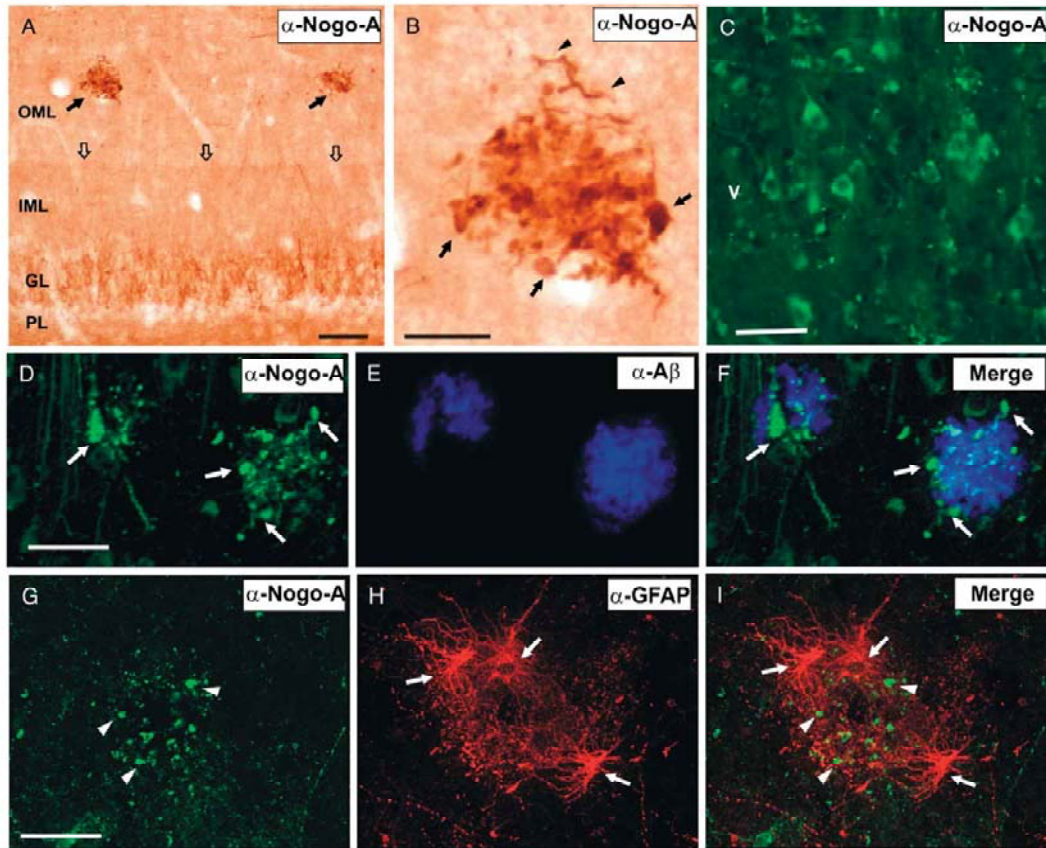


FIGURE 4. Nogo-A immunoreactivity around amyloid aggregates. **(A)** Low-power photomicrograph of the black-boxed area in Figure 3A illustrating the distribution of Nogo-A immunoreactivity in the dentate gyrus in AD sections. Note the intense Nogo-A labeling in the inner molecular layer (open arrows) and the presence of 2 large Nogo-A containing aggregates (arrows) in the outer molecular layer. **(B)** High-magnification photomicrograph illustrating details of Nogo-A-containing aggregates shown in **(A)**. Round (arrows) and dystrophic-immunoreactive (arrowheads) material can be seen. **(C)** High-magnification photomicrographs illustrating details of Nogo-A immunoreactivity in the frontal cortex of a 71-year-old case with AD. **(D-F)** High-magnification illustrating a double-labeled (A β /Nogo-A) aggregate in the subiculum. Nogo-A-immunoreactive material (**[D, F]**, arrows) is not labeled with the A β antibody. **(G-I)** High-power photomicrograph illustrating a double-labeled (GFAP/Nogo-A) aggregate in the hippocampus. Nogo-A-immunoreactive material (arrowheads in G and I) is not labeled with GFAP antibody (**[H, I]**, arrows). A, alveus; CA1-3, cornu ammonis region 1-3; DG, dentate gyrus; EC, entorhinal cortex; GL, granule layer; ML, molecular layer; PL, polymorphic cell layer; S, subiculum, SL, stratum lucidum; SLM, stratum lacunosum-moleculare; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum. Scale bars = **(A)** 100 μ m; **(B-C)** 50 μ m; **(D, G)** 50 μ m pertains to **(E, F)** and **(H, I)**, respectively.

double-labeled sections using α -GFAP and α -Nogo-A antibodies exhibited amorphous Nogo-A-immunoreactive, GFAP-negative material surrounded by GFAP-positive astroglial cells (Fig. 4G-I).

Quantitative Western Immunoblot Analysis of Nogo-A and MBP in AD Hippocampal Formation and Frontal Cortex

Several authors have described increased Nogo-A expression in brain syndromes or diseases (34, 40). Therefore,

we investigated whether differences in Nogo-A cellular expression in AD when compared with age-matched controls correlated with the total Nogo-A protein content (Fig. 5). Immunoblot analysis using the α -Nogo-A antibody detected a band of 200 to 210 kDa in protein extracts from human hippocampi and frontal cortices (AD and non-AD) (Fig. 5A). In these experiments, nitrocellulose membranes were also immunoblotted to determine NSE levels and thereby correlate them to Nogo-A and/or to MBP protein. Densitometric analyses were focused on the 200- to 210-kDa band of

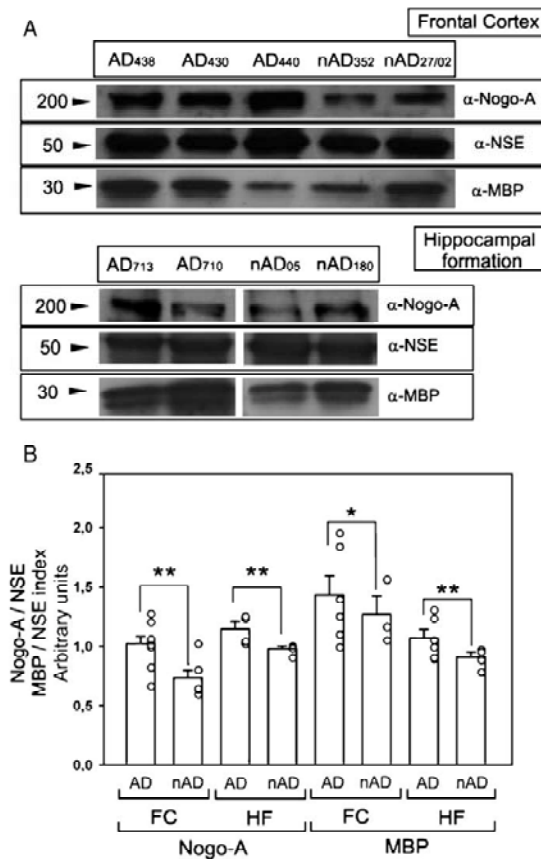


FIGURE 5. Changes in Nogo-A protein levels in the human cortex in AD samples. **(A, B)** Immunoblot of Nogo-A, NSE, and MBP protein levels in the frontal cortex and HF **(A)** and densitometric quantification **(B)** of labeled bands of protein extracts from aged-matched (nAD) (n = 6) and AD (n = 9) patients. Quantitative data in histograms are expressed as the mean of the ratio of Nogo-A or MBP optical density to NSE. Error bars correspond to the standard error. Each dot represents one experiment. Asterisks indicate statistically significant differences between columns (**, $p < 0.05$; *, $p < 0.1$; Student *t*-test)

Nogo-A, the 50-kDa band of NSE, and the 29-21-kDa band of MBP (see Material and Methods for details) (Fig. 5B). Increased Nogo-A protein levels were calculated in samples from frontal cortex and hippocampal formation. A significant increase in Nogo-A protein levels (1.4-fold increase in frontal cortex and 1.17-fold increase in HF; $p < 0.05$, Student *t*-test) was observed in AD compared with age-matched controls (Fig. 5B), thus supporting the view that Nogo-A is over-expressed in AD. MBP protein levels were also increased (1.14-fold increase in frontal cortex; and 1.19-fold increase in

HF; $p < 0.1$ and $p < 0.05$, respectively, Student *t*-test) in AD compared with age-matched controls (Fig. 5B).

DISCUSSION

Myelin-Associated Proteins in Human Hippocampal Formation in Normal Aging and in Alzheimer Disease

We have studied the expression of Nogo-A in normal aging and in AD by using immunocytochemical and Western blotting techniques. Since different results have been published for human samples (33, 34), special care was taken to establish the specificity of the primary α-Nogo-A antibodies used in the present study. The specificity of the primary antibodies was verified by Western blots of brain extracts, as well as by immunostaining of cells transfected with cDNAs encoding human RTN4-A/Nogo-A or RTN4-B/Nogo-B.

The adult distribution patterns of Nogo-A immunoreactivity and cell staining with α-Nogo-A and the NG1 antibodies in aged human hippocampal formation were similar but not identical to those reported in mouse (27, 53) and rats (58). In addition, our results were slightly different than those recently described by Bandtlow et al, where little or no neuronal staining was noted in 30- to 40-year-old human hippocampi (34), but contradictory to reported by Buss et al, who found no labeling of granule and pyramidal cells in the human hippocampus from individuals of 70 to 80 years of age (33). However, we obtained similar results to Bandtlow et al, in epileptic hippocampal sections immunostained with our α-Nogo-A antibody. Thus, these minor differences between the results published by Bandtlow and our own (e.g. granule cell labeling) may reflect age-related changes in the hippocampal circuitry with increased Nogo-A expression in older subjects. Nevertheless, we believe that the discrepancies between our study and that of Buss et al can be attributed to differences in sample manipulation and/or immunocytochemical procedures, because the work of Buss et al was carried out in paraffin sections in which antigenicity might have been reduced. In fact, our preliminary studies had shown that paraffin embedding largely reduces Nogo-A immunoreactivity (unpublished observations). Similar discrepancies have been reported during the characterization of Nogo-A-immunoreactive elements in rodent CNS. Two studies have shown absence of neuronal Nogo-A staining (27, 49). However, Nogo-A immunoreactivity in neurons and oligodendrocytes has been extensively described by several groups and in several species (mice and rats [27, 53, 58], Xenopus [59], and humans [40]), and it has been recently characterized by Dood et al (29). Moreover, it is relevant that Nogo-A is localized in the soma of the granule cells and their axons: for example, the mossy fibers, a non-myelinated connection in humans (Fig. 2). This also occurs in sclerotic and non-sclerotic epileptic hippocampi ([34] and present results). Together, these findings support the hypothesis that Nogo-A may have different roles, including participation in neuronal survival and synaptic

remodeling or stabilization, in addition to those associated with myelin formation and stabilization.

Functions of Myelin-Associated Proteins in AD

A recent study by Tian et al reported that 63.5% of patients with autopsy-confirmed AD displayed a decrease in white matter, particularly in the occipital cortex (60). Although a detailed study of a putative decrease in the white matter was not addressed in the present study, we showed an increase in Nogo-A and a slight increase in MBP protein in the frontal cortex and the HF in advanced AD (stages V/VI of Braak and Braak). As indicated above, Nogo-A is expressed in neurons as well as in oligodendrocytes; in contrast, MBP can be over-expressed by reactive oligodendrocyte progenitors and reactive oligodendrocytes. In addition, it has been reported that, under certain circumstances, a demyelination in the adult CNS can be followed by a considerable degree of repair, at least for several axonal tracts (the cerebellar peduncle), in which axons are invested with new myelin sheaths (61, 62). Thus, the over-expression of certain myelin-associated proteins (e.g. MBP) may form part of the oligodendrocyte responses to axonal impairment, aimed to direct the restoration of myelin sheaths and functional neuronal recovery. Increased expression of myelin-associated proteins (MBP) mRNA in AD has already been reported (45). In the present study, we were unable to distinguish specific over-expression of Nogo-A or MBP in oligodendrocytes. However, we showed by Western blotting that MBP protein levels are slightly increased in AD. This over-expression confirms recent studies reporting the over-expression of other myelin-associated proteins such as MAG and MBP in reactive oligodendrocytes following ischemia (63), CNS lesions (27, 64-66), and in the demyelinating lesions in multiple sclerosis or familial amyotrophic lateral sclerosis (39, 40). While the biological effects of MBP over-expression in several patients remain unknown, we can hypothesize that increased myelin protein synthesis in surviving oligodendrocytes may constitute an attempt to repair affected myelin tracts, as suggested by Jensen et al in the hippocampus following EC lesions (64, 65). In contrast, Nogo-A over-expression in neurons may reflect functions other than myelin stabilization.

A large number of intracellular interactions have been attributed to Reticulon protein family members (22). For example, Nogo-A co-immunoprecipitates with cytoskeletal (α -tubulin) (67), mitochondrial (68), and myelin (MBP) proteins (67), as well as with anti-apoptotic members of the Bcl-2 protein family (54). In addition, members of the Reticulon protein family play relevant roles in the vesicular trafficking of proteins from the endoplasmic reticulum to other intracellular compartments such as the Golgi complex and endosomes (69). Taken together, these findings indicate that Nogo proteins contribute to neuronal physiology and cellular homeostasis.

As mentioned above, we demonstrated increased Nogo-A immunoreactivity by pyramidal cells in the CA3-2 region of the hippocampus in AD when compare with age-matched controls. The entorhino-hippocampal connections are reduced during normal aging, but they are particularly

affected in AD, since extensive loss of projecting neurons from layers II to III of the entorhinal cortex occurs in affected brains (3). In addition, transneuronal cell death of granule cells occurs following entorhinal lesions in experimental animals models (70). In AD brains, axon sprouting from commissural/associative connections increases positive feedback in the dentate gyrus following entorhinal cell loss (71, 72). In addition, Nogo-A and its receptor have been localized in synaptic contacts (27, 29, 73) and the blockade of Nogo-A enhances axonal sprouting in neurons (36, 74, 75). Finally, a fast but transient decrease in Nogo-A expression in cells undergoing axonal sprouting has been reported in lesioned hippocampi (35, 37, 53). Conversely, Nogo-A over-expression has been determined in axotomized neurons (Lam et al, 2005, Soc Neurosci Abstract, A.M. and J.A.D.R., unpublished results). Axonal sprouting and synaptic reorganization also occur in the hippocampus in cases with temporal epilepsy, where severe hippocampal degeneration is often observed, and where increased Nogo-A protein levels have been noted from early non-sclerotic stages (34). While the exact role of Nogo-A in these events is unknown, an interesting possibility which needs further study, is that Nogo-A expression may increase in the neuron after its sprouting process takes place. Thus, delayed Nogo-A over-expression may contribute to reactive synapse formation in AD, perhaps by providing additional synaptic stability beyond the decline predicted from cell loss.

Myelin-Associated Proteins and A β Plaque Formation

In the present study, we described the presence of Nogo-A in neuritic plaques in the hippocampus of AD. These findings are in agreement with the observation of Nogo-A in the vicinity of A β deposits in transgenic mice bearing the APP-Swedish mutation (Prinjha et al, 2003, Soc Neurosci Abstract). However, we were unable to co-immunoprecipitate Nogo-A with A β or APP in AD-affected brains although we used several antibodies (Supplementary Fig. 2). Taken together, these results open challenging questions as whether Nogo-A expression is modulated by A β or their participation in the neurotoxic effect of A β . Interestingly, a recent study by He et al reported that both RTN3 and RTN4-B (Nogo-B) interact with BACE1 (B-secretase), increasing A β production when they were over-expressed (76). Taken together, these results indicate that members of Reticulon proteins may play a role in APP-processing, as well as in A β plaque formation, both of which warrant further analysis. In conclusion, we believe that our study reinforces the hypothesis that Reticulon proteins such as Nogo-A participate in cell responses occurring in AD, thus opening the possibility to consider these proteins as new putative drug targets in AD, as recently suggested in other neurodegenerative disorders (77).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. J. de Felipe and Dr. J. Arellano (Instituto Cajal, CSIC, Madrid) for providing hippocampal

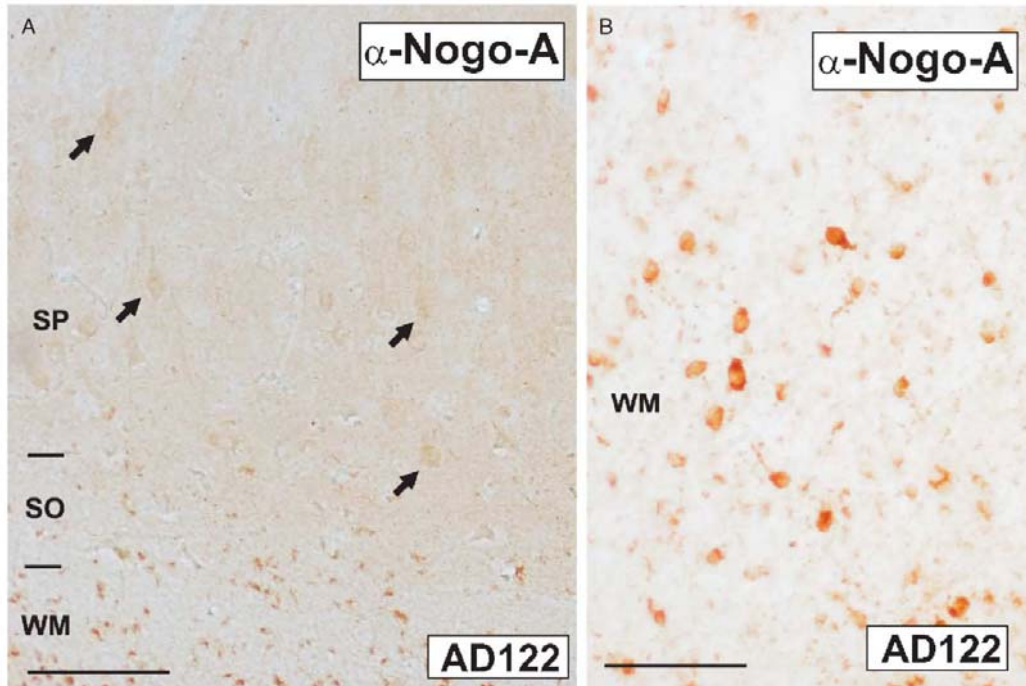
© 2006 American Association of Neuropathologists, Inc.

sections from epileptic patients for this study. The authors also thank Prof. Y. Tsujimoto (Department of Medical Genetics, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan) for providing the HA-tagged human RTN4-A/Nogo-A expression vector; Dr. M. Yutsudo (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan) for providing the RTN4-B/Nogo-B cDNA; and Dr. FL Margolis (Department of Anatomy and Neurobiology, University of Maryland, Baltimore, MD) for providing the antibody against Carnosine. We are also grateful to M López and E Márquez, for technical assistance, as well as R. Rycroft for editorial advice.

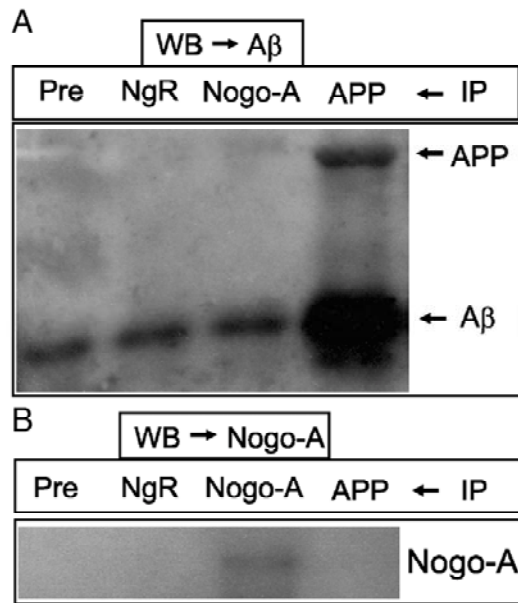
REFERENCES

- Braak H, Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 1998;53:127-40
- Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 1999;399:A23-31
- Braak H, Del Tredici K, Schultz C, et al. Vulnerability of select neuronal types to Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000;924:53-61
- Lorenzo A, Yankner BA. Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1996;777:89-95
- Kowall NW, McKee AC, Yankner BA, et al. In vivo neurotoxicity of beta-amyloid (beta(1-40)) and the beta(25-35) fragment. *Neurobiol Aging* 1992;13:537-42
- Suhara T, Magrane J, Rosen K, et al. Abeta42 generation is toxic to endothelial cells and inhibits eNOS function through an Akt/GSK-3beta signaling-dependent mechanism. *Neurobiol Aging* 2003;24:437-51
- Xu J, Chen S, Ahmed SH, et al. Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. *J Neurosci* 2001;21:RC118
- Whitman GT, Cotman CW. Oligodendrocyte degeneration in AD. *Neurobiol Aging* 2004;25:33-36
- Noble M. The possible role of myelin destruction as a precipitating event in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004;25:25-31
- Wallin A, Gottfries CG, Karlsson I, et al. Decreased myelin lipids in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Acta Neurol Scand* 1989;80:319-23
- Wilkins A, Chandran S, Compston A. A role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. *Glia* 2001;36:48-57
- Wilkins A, Majed H, Layfield R, et al. Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 2003;23:4967-74
- Dai X, Lercher LD, Clinton PM, et al. The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. *J Neurosci* 2003;23:5846-53
- McGeeAW, YangY, FischerQS, et al. Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science* 2005;309:2222-26
- Prinjha R, Moore SE, Vinson M, et al. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 2000;403:383-84
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000;403:439-44
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000;403:434-39
- McKerracher L, David S, Jackson DL, et al. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 1994;13:805-11
- Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, et al. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 1994;13:757-67
- Kottis V, Thibault P, Mikol D, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurochem* 2002;82:1566-69
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 2002;417:941-44
- Oertle T, Schwab ME. Nogo and its pARTNers. *Trends Cell Biol* 2003;13:187-94
- Park JB, Yiu G, Kaneko S, et al. A TNF Receptor Family Member, TROY, Is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 2005;45:345-51
- Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, et al. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 2002;420:74-78
- Shao Z, Browning JL, Lee X, et al. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron* 2005;45:353-59
- Mi S, Lee X, Shao Z, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 2004;7:221-28
- Wang X, Chun SJ, Treloar H, et al. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci* 2002;22:5505-15
- Jin WL, Liu YY, Liu HL, et al. Intraneuronal localization of Nogo-A in the rat. *J Comp Neurol* 2003;458:1-10
- Dodd A, Niederost B, Bloechlinger S, et al. Nogo-A, -B, and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *J Biol Chem* 2005;280:12494-12502
- Josephson A, Widenfalk J, Widmer HW, et al. Nogo mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Exp Neurol* 2001;169:319-28
- Josephson A, Trifunovski A, Widmer HR, et al. Nogo-receptor gene activity: Cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. *J Comp Neurol* 2002;453:292-304
- Al Halabiah H, Delezoide AL, Cardona A, et al. Expression pattern of Nogo and NgR genes during human development. *Gene Expr Patterns* 2005;5:561-68
- Buss A, Sellhaus B, Wolmsley A, et al. Expression pattern of Nogo-A protein in the human nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005;110:113-19
- Bandtlow CE, Dlaska M, Pirker S, et al. Increased expression of Nogo-A in hippocampal neurons of patients with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2004;20:195-206
- Josephson A, Trifunovski A, Scheele C, et al. Activity-induced and developmental downregulation of the Nogo receptor. *Cell Tissue Res* 2003;311:333-42
- Bloechlinger S, Weinmann O, Schwab ME, et al. Neuronal plasticity and formation of new synaptic contacts follow pyramidal lesions and neutralization of Nogo-A: A light and electron microscopic study in the pontine nuclei of adult rats. *J Comp Neurol* 2001;433:426-36
- Meier S, Brauer AU, Heimrich B, et al. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. *FASEB J* 2003;17:1153-55
- Trifunovski A, Josephson A, Ringman A, et al. Neuronal activity-induced regulation of Lingo-1. *Neuroreport* 2004;15:2397-2400
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, di Scala F, et al. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2002;10:358-65
- Satoh J, Onoue H, Arima K, et al. Nogo-A and nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:129-38
- Novak G, Kim D, Seeman P, et al. Schizophrenia and Nogo: elevated mRNA in cortex, and high prevalence of a homozygous CAA insert. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;107:183-89
- Gregorio SP, Mury FB, Ojopi EB, et al. Nogo CAA 3'UTR Insertion polymorphism is not associated with Schizophrenia nor with bipolar disorder. *Schizophr Res* 2005;75:5-9
- Xiong L, Rouleau GA, Delisi LE, et al. CAA insertion polymorphism in the 3'UTR of Nogo gene on 2p14 is not associated with schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;133:153-56
- Rohrer AE, Weiss N, Kokjohn TA, et al. Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Biochemistry* 2002;41:11080-90
- Macq AF, Goossens F, Maloteaux JM, et al. Overexpression of the myelin basic protein RNA in the cortex of a patient with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Belg* 1989;89:316

46. Knopman D. Alzheimer type dementia. In: Dickson D, ed. *Neurodegeneration: Molecular pathology of dementia and movement disorders*. Basel: ISN, University Press, 2003:24–39
47. Braak H, Braak E. Temporal sequence of Alzheimer's disease-related pathology. In: PetersAMJ, ed. *Cerebral Cortex, Vol 14. Neurodegenerative and Related Changes in Structure and Function of Cerebral Cortex*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999: 475–512
48. Alonso-Nanclares L, De Felipe J. Vesicular glutamate transporter 1 immunostaining in the normal and epileptic human cerebral cortex. *Neuroscience* 2005;134:59–68
49. Tozaki H, Kawasaki T, Takagi Y, et al. Expression of Nogo protein by growing axons in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;104:111–19
50. De Marchis S, Melcangi RC, Modena C, et al. Identification of the glial cell types containing carnosine-related peptides in the rat brain. *Neurosci Lett* 1997;237:37–40
51. Marchis SD, Modena C, Peretto P, et al. Carnosine-related dipeptides in neurons and glia. *Biochemistry (Mosc)* 2000;65:824–33
52. Saez-Valero J, Sberna G, McLean CA, et al. Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1999;72:1600–1608
53. Mingorance A, Fontana X, Sole M, et al. Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Mol Cell Neurosci* 2004;26:34–49
54. Tagami S, Eguchi Y, Kinoshita M, et al. A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* 2000;19:5736–46
55. Watari A, Yutsudo M. Multi-functional gene ASY/Nogo/RTN-X/RTN4: apoptosis, tumor suppression, and inhibition of neuronal regeneration. *Apoptosis* 2003;8:5–9
56. Biffo S, Grillo M, Margolis FL. Cellular localization of carnosine-like and aserine-like immunoreactivities in rodent and avian central nervous system. *Neuroscience* 1990;35:637–51
57. Artero C, Marti E, Biffo S, et al. Carnosine in the brain and olfactory system of amphibia and reptilia: A comparative study using immunocytochemical and biochemical methods. *Neurosci Lett* 1991;130:182–86
58. Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, et al. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci* 2002;22:3553–67
59. Klinger M, Diekmann H, Heinz D, et al. Identification of two NOGO/RTN4 genes and analysis of Nogo-A expression in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Neurosci* 2004;25:205–16
60. Tian J, Shi J, Bailey K, et al. Relationships between arteriosclerosis, cerebral amyloid angiopathy and myelin loss from cerebral cortical white matter in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004;30:46–56
61. Yajima K, Suzuki K. Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. *Lab Invest* 1979; 41:385–92
62. Blakemore WF. Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. *J Neurol Sci* 1973;20:73–83
63. Gregersen R, Christensen T, Lehmann E, et al. Focal cerebral ischemia induces increased myelin basic protein and growth-associated protein-43 gene transcription in peri-infarct areas in the rat brain. *Exp Brain Res* 2001;138:384–92
64. Jensen MB, Poulsen FR, Finsen B. Axonal sprouting regulates myelin basic protein gene expression in denervated mouse hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:221–35
65. Drojdahl N, Fenger C, Nielsen HH, et al. Dynamics of oligodendrocyte responses to anterograde axonal (Wallerian) and terminal degeneration in normal and TNF-transgenic mice. *J Neurosci Res* 2004;75:203–17
66. Mingorance A, Fontana X, Soriano E, et al. Over-expression of myelin-associated glycoprotein after axotomy of the perforant pathway. *Mol Cell Neurosci* 2005;29:471–83
67. Taketomi M, Kinoshita N, Kimura K, et al. Nogo-A expression in mature oligodendrocytes of rat spinal cord in association with specific molecules. *Neurosci Lett* 2002;332:37–40
68. Hu WH, Hausmann ON, Yan MS, et al. Identification and characterization of a novel Nogo-interacting mitochondrial protein (NIMP). *J Neurochem* 2002;81:36–45
69. Iwahashi J, Kawasaki I, Kohara Y, et al. Caenorhabditis elegans reticulon interacts with RME-1 during embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:698–704
70. Kovac AD, Kwizinski E, Heimrich B, et al. Entorhinal cortex lesion in the mouse induces transsynaptic death of perforant path target neurons. *Brain Pathol* 2004;14:249–57
71. Cotman CW, Anderson KJ. Synaptic plasticity and functional stabilization in the hippocampal formation: Possible role in Alzheimer's disease. *Adv Neurol* 1988;47:313–35
72. Scheff S. Reactive synaptogenesis in aging and Alzheimer's disease: lessons learned in the Cotman laboratory. *Neurochem Res* 2003;28: 1625–30
73. Liu YY, Jin WL, Liu HL, et al. Electron microscopic localization of Nogo-A at the postsynaptic active zone of the rat. *Neurosci Lett* 2003; 346:153–56
74. Buffo A, Zagrebelsky M, Huber AB, et al. Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured purkinje cell axons. *J Neurosci* 2000;20:2275–86
75. Emerick AJ, Neafsey EJ, Schwab ME, et al. Functional reorganization of the motor cortex in adult rats after cortical lesion and treatment with monoclonal antibody IN-1. *J Neurosci* 2003;23:4826–30
76. He W, Lu Y, Qahwash I, et al. Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation. *Nat Med* 2004;10: 959–65
77. Bornebroek M, Kumar-Singh S. A novel drug target in Alzheimer's disease. *Lancet* 2004;364:1738–39



SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Photomicrographs illustrating Nogo-A immunoreactivity in the hippocampus of a 75-year-old patient. Nogo-A can only be detected clearly in the oligodendrocytes present in the white matter but shows pale staining in principal neurons (interneurons and pyramidal cells) (**A**, arrows). Abbreviations: A, alveus; CA1-3, cornus ammonis region 1-3; DG, dentate gyrus; EC, entorhinal cortex; GL, granule layer; ML, molecular layer; PL, polymorphic cell layer; S, subiculum, SL, stratum lucidum; SLM, stratum lacunosum-moleculare; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum. Scale bars = (**A**) 100 μ m; (**B**) 50 μ m.



SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Immunoblot of A β (**A**) and Nogo-A (**B**) after immunoprecipitation of AD proteins extracts (Table) with pre-immune serum (Pre), Nogo-A and APP antibodies. Nogo-A does not co-immunoprecipitate with A β (**A**) and APP (**B**).

*RESUMEN DE RESULTADOS
Y DISCUSIÓN*

La unión de cualquiera de los ligandos, Nogo-A, OMgp o MAG al complejo Nogo receptor desencadena una señalización intracelular que conlleva la inhibición de la regeneración axonal tras lesión. Este complejo está formado por tres proteínas, NgR1, Lingo-1 y p75^{NTR}/TROY. Sin embargo, las evidencias demuestran un número variado de funciones para los ligandos del complejo distintas a la relacionada con la inhibición de la regeneración axonal en el adulto. Lo mismo ocurre con los componentes del complejo Nogo receptor, ya que inicialmente p75^{NTR} fue descrito como receptor de baja afinidad para NGF (Chao, 1994) y TAJ/TROY fue identificado como miembro de la superfamilia TNFR, capaz de mediar muerte celular independiente de caspasa 3 (Eby et al., 2000). Asimismo, se ha demostrado que la participación de NgR1 en la inhibición de la regeneración axonal sólo es relevante en los primeros estadios tras lesión (fase aguda) y que la inhibición derivada de mielina es independiente de NgR1 en estadios crónicos (Chivatakarn et al., 2007). Estos mismos autores sostienen que otros receptores de mielina, como NgR2, además del complejo Nogo receptor, pueden tomar parte previniendo la extensión axonal de un modo específico de tipo celular (Venkatesh et al., 2005; Venkatesh et al., 2007). Con todo esto, era razonable considerar que las funciones de Lingo-1 todavía no estaban completamente determinadas, y que, como primer paso para averiguarlas, se necesitaba de un estudio detallado de su patrón de expresión durante el desarrollo y de su distribución celular.

Por otra parte, en el momento de iniciarse el presente trabajo, existían ciertas discrepancias en cuanto al tipo celular en el que se expresaba OMgp. Algunos estudios sostenían una localización exclusiva en oligodendrocitos (Mikol and Stefansson, 1988), mientras que otros proponían una expresión neuronal (Habib et al., 1998b; Hunt et al., 2002a). Estas diferencias son muy similares a las observadas años atrás en cuanto a la expresión neuronal y oligodendroglial de Nogo-A (Mingorance et al., 2004). Además, todos los estudios de expresión descritos hasta la fecha se centraban en estadios postnatales y adultos, pero no en estadios embrionarios. Por ello, uno de nuestros objetivos fue profundizar en la distribución celular y regional de la proteína OMgp a lo largo del desarrollo y determinar posibles funciones adicionales.

Por último, algunos estudios habían descrito la implicación de algunas proteínas de la mielina, como Nogo-A, además de otros Reticulones en diversas enfermedades neurodegenerativas, e incluso se había indicado una interacción entre RTN3 y NogoB

con la enzima β -secretasa, lo que causaba una disminución en la síntesis de péptido A β (He et al., 2004). Estas evidencias llevaron a plantearnos la posibilidad de que la expresión de Nogo-A pudiera estar alterada en AD.

A continuación, se muestran los principales resultados obtenidos durante el desarrollo de los objetivos de la presente Tesis Doctoral.

I. Proteínas inhibidoras asociadas a mielina (MAIPs) en SNC intacto

1.1 Expresión de MAIPs durante el desarrollo y en etapa adulta

Nuestros análisis demuestran que las proteínas Lingo-1 y OMgp se expresan en el cerebro de ratón a lo largo del desarrollo, desde estadios muy tempranos, y también en la etapa adulta.

En cuanto a Lingo-1, existen diferencias de expresión a lo largo al eje AP, siendo las regiones anteriores las que muestran mayor inmunoreactividad. Pero además, también hay diferencias a lo largo del desarrollo. En las regiones anteriores, se produce un pico de expresión alrededor del día P21, mientras que en regiones posteriores (cerebelo y núcleos basales) la expresión es máxima alrededor de P5. El hecho de que existan diferencias en cuanto al eje AP y al eje temporal, junto con la particularidad de que Lingo-1 se expresa en la mayoría de poblaciones neuronales, pero no en todas, sugiere que puede desempeñar diversas funciones según la región y el momento de su expresión. Así, lo más probable es que ejerza funciones de señalización en estadios tempranos durante el desarrollo y funciones asociadas a la inhibición de la regeneración axonal en etapas más posteriores. Además, nuestros resultados demuestran que Lingo-1 se expresa en varias regiones del cerebro durante la etapa embrionaria en las que no se expresa NgR1, lo que refuerza la idea anterior. Por otra parte, dada la extensa presencia de Lingo-1 en estadios embrionarios tan tempranos, cabría esperar un efecto negativo en el desarrollo del animal deficiente en Lingo-1. Sin embargo, dicho animal apenas presenta graves alteraciones (Mi et al., 2005), al igual que ocurre en ratones carentes de NgR1 o de ligandos del complejo Nogo receptor, siendo todos ellos viables (Filbin, 1996; Kim et al., 2003; Simonen et al., 2003; Zheng et al., 2003; Zheng et al., 2005). Esto indica un papel redundante de los miembros del complejo receptor que puede ser compensado por otras moléculas.

En cuanto a la expresión de Lingo-1 en neuronas, fue imposible determinar una clara correlación entre su expresión y un fenotipo neuronal específico. Sin embargo, se pueden obtener algunas conclusiones a partir de los datos obtenidos. En primer lugar, la expresión neuronal de la proteína Lingo-1 no está asociada exclusivamente a neuronas mielinizadas puesto que neuronas no mielinizadas muestran niveles altos de Lingo-1 (por ejemplo, neuronas del *septum* e hipocampo). Además, algunas de estas neuronas carecen de NgR1 en el adulto, como por ejemplo, células colinérgicas del área septal (Barrette et al., 2007; Hunt et al., 2002a; Hunt et al., 2002b). En este sentido, las evidencias actuales indican que algunos factores de crecimiento involucrados en supervivencia neuronal, especificación axonal y en la conectividad de determinadas poblaciones neuronales durante el desarrollo también participan en la mielinización. Se ha mostrado que NGF induce la expresión de Lingo-1 en cultivos de DRG inhibiendo la mielinización axonal (Lee et al., 2007) (ver Introducción, apartado 3.7). Por tanto, es tentador sugerir que la expresión de Lingo-1 en células colinérgicas del *septum* medial pueda estar regulada por NGF para inhibir la mielinización de fibras colinérgicas durante su maduración. De hecho, parece que Lingo-1 y NgR1 tienen una regulación opuesta bajo ciertas condiciones experimentales en el adulto. Por ejemplo, los tratamientos con BDNF o ácido kaínico incrementan la expresión de Lingo-1 y disminuyen la de NgR1 en neuronas hipocámpicas (Josephson et al., 2003; Mingorance et al., 2004; Trifunovski et al., 2004). Por tanto, es necesario determinar si Lingo-1 y NgR1 tienen actividades opuestas o compensatorias durante el desarrollo neuronal.

Por otra parte, hay que señalar que no hemos detectado Lingo-1 en oligodendrocitos mielinizantes (positivos para la proteína de mielina MAG) a la edad de P15 (Capítulo 1, Figura suplementaria 4). Estos datos son consistentes con otros resultados recientes a nivel de ARNm (Barrette et al., 2007), pero están en desacuerdo con otros estudios previos (Mi et al., 2005). Sin embargo, otro estudio llevado a cabo en cerebros de pacientes de esclerosis múltiple demuestra que Lingo-1, y también TROY, se expresa en astrocitos reactivos y microglía pero no en oligodendrocitos y que los niveles de Lingo-1 están disminuídos en pacientes de esclerosis múltiple (Satoh et al., 2007). Estos resultados tan contradictorios pueden ser explicados por diferencias en las muestras, ya sea por la especie animal o por la edad en la que se llevaron a cabo los diversos estudios. Así, Lingo-1 se expresa antes de P7 (en rata) en oligodendrocitos

premielinizantes (Mi et al., 2005) pero no en oligodendrocitos maduros (en ratón, presente trabajo y (Barrette et al., 2007)). Una posible explicación es que el gen de Lingo-1 se exprese en oligodendrocitos premielinizantes y posteriormente es regulado a la baja en oligodendrocitos maduros. Este hecho es compatible con el fenotipo derivado de la pérdida de función y de la sobreexpresión de formas dominantes y salvajes de Lingo-1 en oligodendrocitos (Mi et al., 2005). Así, la sobreexpresión de Lingo-1 conlleva la inhibición de la diferenciación oligodendroglial y de la mielinización. Por el contrario, la pérdida de función de Lingo-1 en oligodendrocitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Lingo-1 *knockout*) conlleva un aumento en longitud y número de los procesos de los oligodendrocitos y un aumento de la formación de vainas de mielina. Por tanto, la principal conclusión del modelo de pérdida de función de Lingo-1 es que dicha proteína debe tener una actividad inhibitoria en la diferenciación de oligodendrocitos y en la mielinización. Como ya se ha comentado, se ha descrito que NGF inhibe la mielinización al incrementar los niveles de Lingo-1 en neuronas (Lee et al., 2007). Sin embargo, se desconocen los mecanismos mediante los cuales Lingo-1 participa en la maduración de los oligodendrocitos mielinizantes y los factores que determinan sus niveles de expresión durante el desarrollo.

En cuanto a la expresión de OMgp en el telencefalo, cabe destacar que aparece en estadios del desarrollo muy temprano, previos incluso al inicio de la mielinización, siendo los tractos axonales los primeros en mostrar inmunoreactividad. En general, nuestros resultados refuerzan la idea de que OMgp se expresa en oligodendrocitos en el adulto y en neuronas tanto *in vivo* como *in vitro*. La expresión de OMgp en estadios tan tempranos del desarrollo, anterior a la expresión de NgR1 y al inicio de la mielinización, sugiere que OMgp puede ejercer durante el desarrollo perinatal funciones diferentes a la formación de nodos de Ranvier y a la inhibición del crecimiento axonal tras lesión (Huang et al., 2005; Nie et al., 2006; Wang et al., 2002b).

Si comparamos los niveles de expresión de los ligandos y receptores del complejo en el telencefalo, podemos ver que algunos miembros del complejo muestran expresión temprana, como es el caso de Nogo-A, OMgp y Lingo-1, por lo que estarían desempeñando funciones no asociadas a inhibición mediada por mielina en estas etapas (Figura 30). Por ejemplo, se ha descrito que durante el desarrollo, Nogo-A está involucrado en diversas funciones como modulación de migración tangencial

(Mingorance-Le Meur et al., 2007), crecimiento neurítico (Mingorance-Le Meur et al., 2007; Montani et al., 2009; Richard et al., 2005), direccionamiento axonal (Wang et al., 2008b; Wang et al., 2008c) y diferenciación neural (Wang et al., 2008a). De igual manera, OMgp y Lingo-1 pueden ejercer otros papeles, como veremos posteriormente.

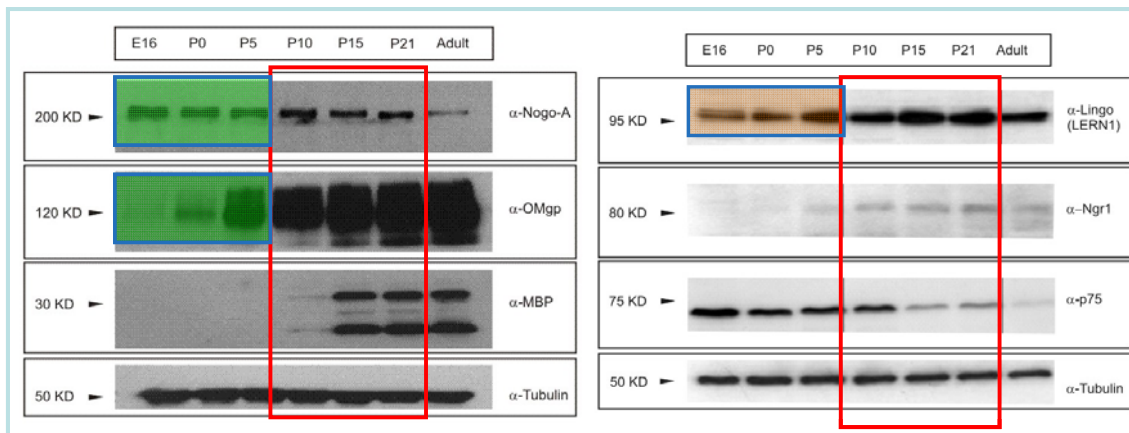


Figura 30. Análisis de los niveles de expresión por *Western blot* de los ligandos, Nogo-A y OMgp, y de los receptores, Lingo-1, NgR1 y p75^{NTR} durante el desarrollo del cerebro de ratón. La expresión de la proteína MBP nos indica el inicio de la mielinización.

Sin embargo, NgR1 aparece de forma más tardía, coincidiendo con la mielinización, posiblemente para posibilitar la estabilización de las conexiones e impedir *sprouting* aberrante. En lo referente al resto de componentes del complejo receptor, observamos una elevada expresión de Lingo-1 y p75^{NTR} en ausencia de NgR1 en estadios tempranos de desarrollo, mientras que en etapas adultas, los niveles de p75^{NTR} disminuyen aunque aumenta NgR1. Estas diferencias sugieren que los patrones de expresión de los miembros del complejo se solapan en determinados momentos, aunque no están uniformemente presentes en el cerebro intacto como para poder responder a sus ligandos.

Por otra parte, al inicio de este trabajo, Lingo-1 había sido propuesto como miembro esencial del complejo receptor para las MAIPs (Mi et al., 2004). Sin embargo, no se había descrito la coexistencia de los tres miembros en el mismo tipo celular y compartimento. De hecho, todos los resultados que sostenían esta teoría habían sido realizados en células cotransfectadas con las tres moléculas, por lo que se desconocía si

la formación de complejo tenía lugar *in vivo* en condiciones fisiológicas normales. Por ello, analizamos los niveles de expresión de todos los componentes del complejo, a nivel de proteína, a lo largo del desarrollo del cerebro de ratón.

Nuestros resultados muestran el gran solapamiento en la expresión de los miembros del complejo en estadios postnatales, desde P10 hasta P21, sugiriendo una ventana temporal para la actividad del complejo Lingo-1/NgR1/p75^{NTR} en un periodo crítico para la maduración del SNC y de la mielinización (Figura 31).

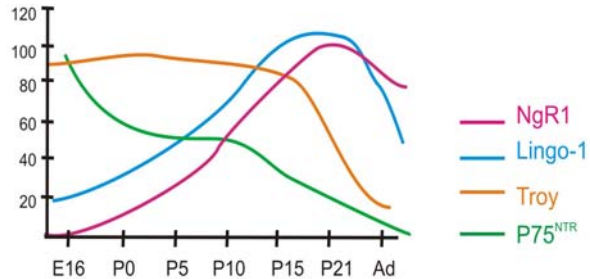


Figura 31. Niveles máximos de expresión de proteína por *Western blot* durante el desarrollo del telencéfalo de ratón.

Además de la coexistencia de los componentes del complejo en los mismos estadios del desarrollo, también corroboramos que esta colocación ocurría en el mismo compartimento celular, en concreto, en fracciones de membrana plasmática y de RE de extractos de cerebro de P7. También observamos que tanto NgR1 como p75^{NTR} eran capaces de coimmunoprecipitar con Lingo-1, lo que indica que las tres moléculas son capaces de interactuar *in vivo*. Por tanto, nuestro estudio apoya la existencia de complejos *in vivo* en el SNC intacto y refuerza la esencialidad de Lingo-1 para la función del complejo Nogo receptor a partir de la segunda semana postnatal.

No obstante, también observamos que Lingo-1 está presente en fracciones celulares que no contienen NgR1. De igual manera, por técnicas inmunohistoquímicas detectamos expresión de Lingo-1 en áreas donde no se expresa NgR1, como *septum*, núcleos hipotalámicos o *substantia nigra* (Barrette et al., 2007), lo que apunta la posibilidad de otras funciones de Lingo-1 no relacionadas con regeneración axonal. Respecto a esto, Ji y colaboradores demostraron que el tratamiento con la forma soluble de Lingo (Lingo-Fc), que bloquea la interacción Lingo-1/NgR1, promueve la recuperación funcional y el *sprouting* colateral de axones intactos tras lesión de médula espinal, pero también previene a neuronas y oligodendrocitos de la muerte celular que tiene lugar en las primeras fases (fase aguda) tras lesión (Ji et al., 2006). Por otra parte, se ha descrito que la presencia de NgR1 en la inhibición de la regeneración axonal es requerida sólo para etapas agudas postlesión, pero no para periodos crónicos (Chivatakarn et al., 2007), por lo que quizás sea posible que Lingo-1 participe en la inhibición prolongada

independiente de NgR1 en lesiones crónicas. En este sentido, se ha mostrado que los niveles de ARNm y proteína de Lingo-1 son inducidos en el asta ventral de la médula espinal de rata de 7 a 14 días después de la lesión (Mi et al., 2004). Otra posibilidad es que pueda modular otros receptores inhibitorios asociados a mielina como NgR2 (Venkatesh et al., 2005). Tampoco podemos descartar el hecho de que los componentes del complejo ejerzan distintas funciones no sólo según la etapa en la que se expresan, sino también específicas de tipo celular.

1.2 Interacción del complejo Nogo receptor con otros factores: Myt11, WNK1 y PirB

Se ha demostrado que la región intracelular de Lingo-1 es esencial para su actividad, puesto que la delección de este dominio transforma a la molécula en una forma dominante negativa, afectando a la unión a ligandos, a la inhibición del crecimiento neurítico y activación de RhoA y a la diferenciación oligodendroglial y mielinización (Ji et al., 2006; Lee et al., 2007; Mi et al., 2004). Nuestros resultados sugieren que la pérdida del dominio intracelular de Lingo-1 no afecta a la unión con NgR1 y p75^{NTR}, por lo que el complejo puede formarse, pero si interfiere en su señalización. Se ha descrito que Lingo-1 forma homotetrámeros (Mosyak et al., 2006), por lo que es posible que la sobreexpresión de las formas delecionadas conlleve la formación de heterotetrámeros no funcionales con las propiedades de señalización afectadas, aunque siga siendo capaz de interactuar con p75^{NTR} y NgR1.

Para comprender mejor la función del dominio intracelular de Lingo-1 en la señalización intracelular, realizamos ensayos de doble híbrido en búsqueda de moléculas capaces de interactuar con dicho dominio en una librería de ADNc fetal. Como resultado obtuvimos que el dominio interactuaba con el factor de transcripción con motivos *dedos de zinc* **Myt11** (del inglés *Myelin transcription factor 1-like*) también conocido como png-1 o NZF-1 (Kim et al., 1997; Weiner and Chun, 1997). Esta interacción es factible ya que ambas proteínas presentan una sublocalización celular y un patrón de expresión en el hipocampo similar. Aunque se necesita determinar la relevancia de esta interacción *in vivo* y la respuesta celular que desencadena, es interesante señalar que los niveles de proteína de Myt11 en el

citoplasma incrementan en condiciones regenerantes de médula espinal (Wrathall et al., 1998), y lo mismo ocurre para Lingo-1 (Mi et al., 2004). De acuerdo con estas observaciones, se pueden proponer dos posibles mecanismos de acción: a) Lingo-1 podría interactuar con Myt11 para regular su actividad de factor de transcripción reteniéndolo en el citoplasma; b) Lingo-1 podría transducir señales intracelulares al secuestrar cofactores de Myt11. Por otra parte, existe una proteína homóloga a Myt11, **Myt1**, que se expresa en oligodendrocitos y modula la proliferación y diferenciación de los mismos al regular la transcripción del gen PLP, el mayor componente de la mielina, (Kim et al., 1997; Nielsen et al., 2004). Puesto que Lingo-1 y Myt11 interactúan en neuronas, también es posible que tenga lugar una interacción entre Lingo-1 y Myt1 en oligodendrocitos. Como ya se ha comentado anteriormente, Lingo-1 tiene una actividad inhibitoria en la diferenciación de oligodendrocitos y en la mielinización, por lo que podemos pensar que Lingo-1 inhibe la diferenciación oligodendroglial al inhibir, a través de Myt1, la expresión de determinados genes como PLP (Kim and Hudson, 1992). Sería de gran interés analizar los niveles de expresión de Myt11 a lo largo del desarrollo y determinar en qué etapas interacciona con Lingo-1.

Myt1 también ha sido implicado en neurogénesis en los primeros estadios de desarrollo neural como un modulador clave de factores de transcripción neurogénicos asociados a la vía Notch/Delta, siendo su actividad esencial para la diferenciación neuronal (Bellefroid et al., 1996). Es relevante señalar que los niveles de Lingo-1 aumentan en regiones neurogénicas en el adulto, como el DG, tras estímulos mitogénicos (inyecciones de BDNF o ácido kaínico) (Trifunovski et al., 2004). Por tanto, es posible que Lingo-1 pueda ejercer un papel en la proliferación o especificación de células neurales regulando la actividad de Myt1 y Myt11, además de modular a Myt1 para prevenir la diferenciación terminal de oligodendrocitos. Aún así, la hipótesis de que sus efectos son mediados por Myt1 en oligodendrocitos y Myt11 en neuronas necesita de estudios más profundos.

Dado que NgR1 no tiene dominio intracelular, se ha propuesto que NgR1 debe actuar como reclamo para unir Nogo-A, MAG o OMgp al complejo, pero la transducción de la señal se efectúa a través de p75^{NTR} o TROY, que si tienen dominio citoplasmático (Mi et al., 2004; Shao et al., 2005). Nuestros resultados acerca de la interacción con Myt11 sugieren un nuevo mecanismo de señalización a la ya descrita contribución de p75^{NTR} y TROY, al incorporar una segunda función de transducción de señal mediada por el

dominio intracelular de Lingo-1. Además, no hay que olvidar que, aunque el dominio C-terminal intracelular es de pequeña longitud, contiene un sitio putativo de fosforilación en Tirosina similar a EGFR, conservado en Lingo-1, 2 y 3 pero no en Lingo-4. Y aunque la fosforilación de este residuo de tirosina no se ha demostrado *in vivo*, la presencia de este dominio implica la posibilidad de otra vía de señalización.

Recientemente, se ha llevado a cabo un experimento similar al realizado por nuestro grupo, focalizado en la búsqueda de nuevas moléculas capaces de interactuar con el dominio intracelular de Lingo-1 mediante ensayo de doble híbrido. En él se ha descrito la interacción entre Lingo-1 y **WNK1**, una quinasa en Serina/Treonina (Zhang et al., 2009b). La subfamilia de quinastas WNK (*with no lysine [K]*), compuesta por WNK1, WNK2, WNK3 y WNK4, está implicada en transporte y homeostasis iónica, lo que contribuye a la regulación de la presión sanguínea. También han sido relacionadas con crecimiento celular, diferenciación y apoptosis y aunque se expresan en el cerebro, su función en sistema nervioso aún no ha sido descrita. Sin embargo, se conoce que mutaciones en el exón específico de sistema nervioso del gen WNK1 causa la enfermedad HSANII (del inglés *Hereditary sensory and autonomic neuropathy type II*), caracterizada por la falta de percepción al dolor, tacto y calor debido a una pérdida de nervios periféricos sensoriales. La interacción entre Lingo-1 y WNK1 ha sido demostrada por coimmunoprecipitación en extractos de cerebro de rata en estadio P1 y se ha descrito que ambas moléculas colocalizan en neuronas corticales tanto *in vivo* como *in vitro*. Sorprendentemente, esta interacción está favorecida por tratamiento con Nogo-66. Además, se ha observado que la supresión o la sobreexpresión de WNK1 atenúan la inhibición de crecimiento neurítico inducida por Nogo-66 e inhiben la activación de RhoA, por lo que se sugiere un nuevo mecanismo implicado en la inhibición de extensión neurítica mediada por Lingo-1.

En un intento por identificar nuevos receptores para las MAIPs, se ha descrito un segundo receptor neuronal, **PirB**, capaz de unirse con gran afinidad a Nogo-A, MAG y OMgp y causar la inhibición del crecimiento neurítico (Atwal et al., 2008). Este nuevo receptor, parece actuar de forma conjunta con NgR1 en la inhibición por mielina a corto plazo (ensayos de colapso de cono axonal), pero de forma independiente a NgR1 en inhibición a largo plazo (inhibición de crecimiento neurítico mediada por sustrato). Hasta la fecha, se había descrito a la proteína PirB (del inglés *Paired-immunoglobulin-like receptor B*) como receptor de MHC1 (del inglés *Major Histocompatibility*

Complex class I). Su dominio citoplasmático contiene 4 motivos inhibidores basados en inmunoreceptor de tirosina (ITIMs) (Figura 33A), que al fosforilarse recluta a fosfatasa SHp-1 y SHp-2 modulando funciones de señalización en sistema inmune. Pero además, PirB está presente en el SNC, y se asocia a sinapsis. También se ha mostrado que limita la plasticidad sináptica en sistema visual de ratón no sólo en el periodo crítico de establecimiento de la conexión sino a lo largo de toda la vida del animal (Syken et al., 2006).

Aunque parece clara la función de PirB en inhibición axonal, aún está por determinar si PirB forma parte del complejo receptor clásico o si por el contrario actúa de forma independiente a éste. Igualmente, se desconoce si la señalización desencadenada por PirB converge en la vía RhoA (Figura 32).

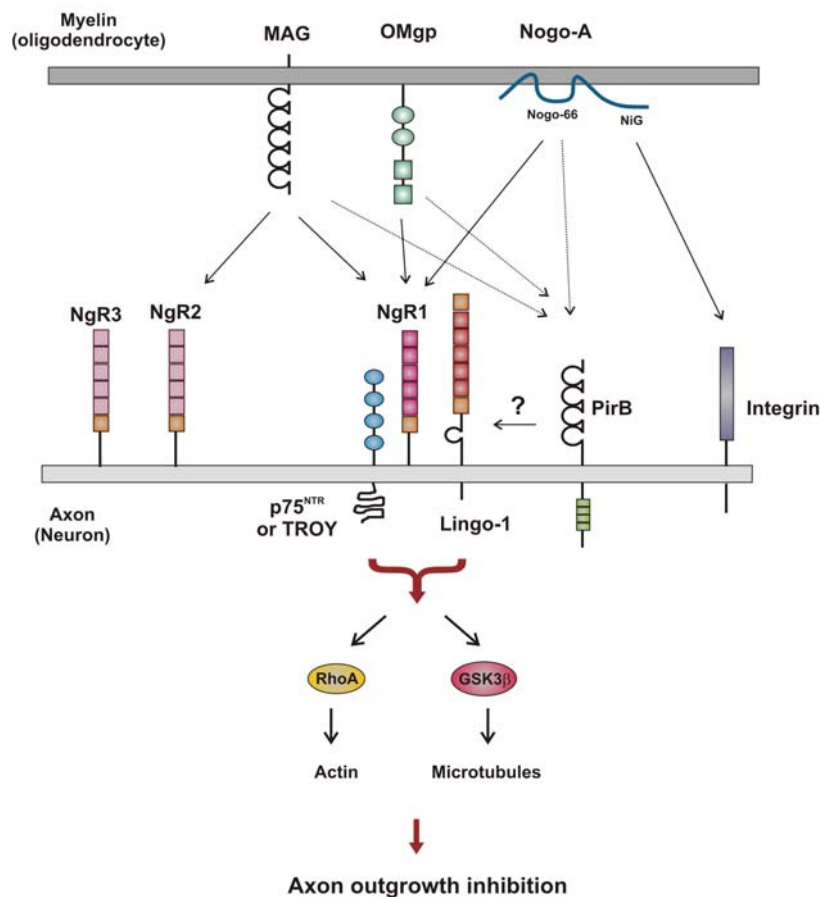


Figura 32. Inhibición de regeneración axonal mediada por MAIPs. Las proteínas asociadas a mielina, Nogo-A, MAG y OMgp inhiben el crecimiento neurítico a través de su unión al complejo Nogo receptor (formado por NgR1, p75/TROY y Lingo-1) o por la unión a PirB. Una tercera vía de inhibición es llevada a cabo por la unión de Nogo-A, a través de su fragmento N-terminal, a integrinas. En último término, la desorganización del citoesqueleto, tanto por la alteración de los filamentos de actina como de los microtúbulos, conlleva la retracción axonal.

En un intento por profundizar en el papel de PirB, hemos analizado su nivel de expresión en referencia a los niveles de los miembros del complejo Nogo receptor a lo largo del desarrollo (Figura 33B). Así, hemos podido comprobar como PirB, debido a sus altos niveles de expresión por *Western blot* en estadios embrionarios y perinatales, podría ser un perfecto receptor, especialmente para Nogo-A y OMgp, en estas etapas, cuando los niveles de NgR1 no son elevados. Pero sobretodo, lo más importante es que PirB podría ser la molécula que permitiera aquellas otras funciones que se han descrito para las MAIPs y que no están relacionadas con la inhibición axonal.

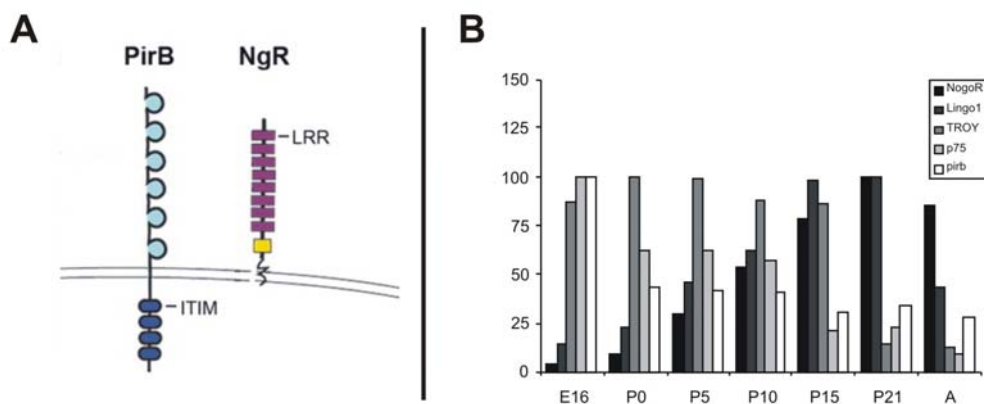


Figura 33. A) Representación esquemática de la estructura de PirB y NgR1 (*Adaptado de Atwal et al., 2008*). B) Densitometría de los niveles de expresión de proteína de los componentes del complejo Nogo receptor y PirB en telencéfalo de ratón. Los niveles son expresados tomando el máximo valor como 100%.

1.3 OMgp y Lingo-1 podrían modular la función GABAérgica

El estudio de la expresión de OMgp y Lingo-1 en el hipocampo nos ha revelado otro dato muy destacable como es la elevada expresión de ambas moléculas en neuronas no principales del hipocampo a partir de P15 y especialmente en estadios adultos. El marcaje está presente en soma, dendritas y axón, y aparece en interneuronas de diversa morfología y en todos los estratos. Por ello, analizamos diversas subpoblaciones positivas para proteínas de unión a calcio, como Parvalbúmina, Calretinina y Calbindina, y para los neuropéptidos CCK y Somatostatina. Tanto Lingo-1 como OMgp están presentes en dichas subpoblaciones, sin embargo, no pudimos fijar ningún tipo específico de interneuronas ni una distribución en particular.

No obstante, hay que tener presente que al menos existen interneuronas positivas para Calbindina o Parvalbúmina que expresan tanto Lingo-1 como OMgp (Capítulo 1, Figura 3; Capítulo 2, Figura 4). Esto abre la posibilidad de que Lingo-1 y OMgp estén presentes en el mismo tipo de interneurona y, que incluso, puedan estar interaccionando entre sí. Por ello, realizamos doble inmunofluorescencia para detectar si OMgp y Lingo-1 se expresan en el mismo tipo celular (Figura 34).

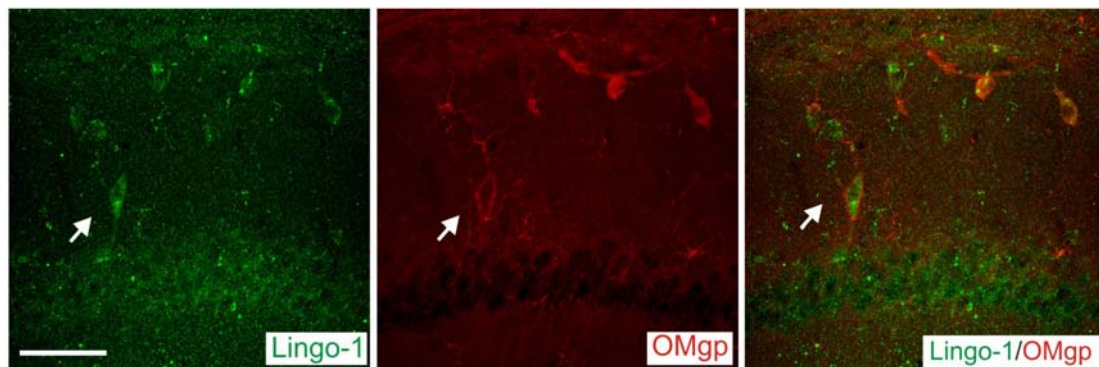


Figura 34. Fotografías por microscopía confocal que muestran interneuronas positivas para Lingo-1 y OMgp en el estrato oriens del hipocampo. Escala: 25 μ m.

Aunque habría que confirmar si ambas moléculas son capaces de interaccionar, su presencia en el mismo tipo de interneuronas sugiere que Lingo-1 y OMgp puedan estar interaccionando directa o indirectamente en determinadas subpoblaciones para modular su función.

Por ejemplo, podemos hipotetizar que Lingo-1 interviene en la diferenciación de las interneuronas a través de BDNF. Es bien conocido que BDNF influye en el fenotipo de las interneuronas GABAérgicas (Rutherford et al., 1997) y en su posicionamiento final en capas corticales (Alcantara et al., 2006) y que promueve la maduración de la inhibición cortical durante la vida postnatal temprana, regulando por tanto el periodo crítico de la plasticidad cortical visual (Huang et al., 1999).

Asimismo, y como ya se ha comentado, BDNF aumenta la expresión de Lingo-1 y disminuye la de NgR1. Puesto que BDNF es ligando para TrkB y p75^{NTR}, y NGF, a través de TrkA, induce la expresión de Lingo-1 para inhibir diferenciación oligodendrocitos, nos podríamos plantear la posibilidad de que BDNF aumenta la

expresión de Lingo-1, a través de TrkB para inducir la maduración GABAérgica (Figura 35).

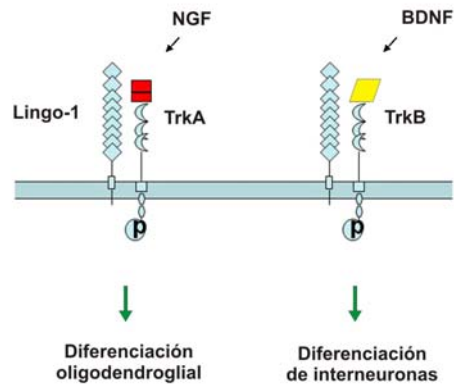


Figura 35. Posibles mecanismos de señalización de Lingo-1 y receptores Trk en respuesta a neurotrofinas.

Por otra parte, la aparición de la expresión de OMgp en interneuronas coincide en el tiempo con la aparición de los primeros potenciales inhibitorios en estadios postnatales en el hipocampo (Cherubini et al., 1991), por lo que es bastante probable que también pueda intervenir OMgp en este proceso. Además, teniendo en cuenta, que tanto como Lingo-1 como OMgp se expresan en terminales presinápticos, es probable que puedan modular la inhibición sináptica. En línea con esto, se ha descrito que interneuronas de corteza y de la región CA1 expresan el epítipo HNK-1 y que la aplicación de anticuerpo anti-HNK-1 reduce la liberación de GABA por interneuronas, alterando la inhibición perisomática y los procesos de LTP (Inoue et al., 2007b; Yamamoto et al., 2002). Aunque no se ha descrito qué molécula es la portadora de este epítipo en estas interneuronas, se conoce que está presente en OMgp entre otras (ver más adelante). Por tanto, este dato respaldaría una posible función de OMgp en interneuronas a través de su epítipo HNK-1. Sin embargo, serían necesarios experimentos de señalización y análisis de los cambios en la transcripción dependientes de señalización por BDNF en células que expresan Lingo-1 y OMgp para confirmar esta hipótesis. También sería interesante analizar en detalle el papel que ejerce HNK-1 unido a OMgp en estas interneuronas.

1.4 ¿Pueden intervenir las MAIPs en transmisión sináptica?

Según nuestros estudios, OMgp está presente en neuronas de cultivos primarios de hipocampo y, en particular, en varicosidades axonales positivas para marcadores presinápticos como Sinapsina. Pero además, esta localización presináptica también tiene lugar *in vivo*, ya que en ensayos de fraccionamiento de sinaptosomas de cerebros

adultos, observamos que OMgp está presente en las fracciones correspondientes a membrana y vesículas, las mismas en las que están presentes marcadores presinápticos como Syntaxin 1 y SNAP-25. Por tanto, podemos concluir que OMgp se encuentra en terminales presinápticos durante el desarrollo y también en etapa adulta.

Este hecho nos sugirió la posibilidad de que OMgp estuviera actuando a nivel de sinapsis. Se ha descrito que otros miembros de la vía de señalización de MAIPs también se localizan en contactos sinápticos. Por ejemplo, Nogo-A y NgR1 están presentes en terminal presináptico y postsináptico (Lee et al., 2008; Liu et al., 2003; Wang et al., 2002c), mientras que Lingo-1 se encuentra sólo en la región presináptica. Una posibilidad es que la función de estas proteínas sea meramente estructural, por ejemplo, modulando el citoesqueleto y su dinámica para mantener la estructura de la sinapsis. Así, se ha observado que NgR1 interviene en la regulación de la morfología de las espinas dendríticas de neuronas de CA1 en el hipocampo (Lee et al., 2008). No obstante, también es posible que participen activamente en la transmisión sináptica, sirviendo como ejemplo la modulación que ejerce NgR1 mediante la interacción con FGF2-FGFR en procesos sinápticos (Lee et al., 2008). Por ello, sería de gran utilidad determinar la posible interacción de OMgp con componentes activos y/o estructurales de la sinapsis, así como la interacción entre los diferentes miembros del complejo Nogo receptor en fracciones sinaptosomales.

A la vista de estos resultados, y en un intento por determinar la posible participación de OMgp en la sinapsis, hemos utilizado dos aproximaciones experimentales, como son efecto de OMgp en la movilización del calcio intracelular y efecto de OMgp en la actividad espontánea de cultivos primarios de hipocampo.

Efecto de OMgp en la movilización del calcio intracelular. Un incremento en la concentración de calcio intracelular puede desencadenar diversas señales, entre ellas la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular y la proliferación celular. El método aquí empleado se basa en la medición de calcio intracelular a través de un indicador fluorescente, Fluo-4/AM, en cultivos primarios de hipocampo de 4 DIV. Cuando este fluorocromo está unido al calcio intracelular y es excitado en la región del azul emite fluorescencia. Las células en reposo cargadas con el fluorocromo presentan una fluorescencia basal (F_0), que se incrementa (F) al adicionar compuestos capaces de

aumentar la concentración intracelular de calcio, ya sea por entrada de calcio del medio extracelular o por la liberación del calcio almacenado en RE. Los cambios en la concentración intracelular del calcio a tiempo real son expresados como el cambio relativo en el ratio F/F_0 .

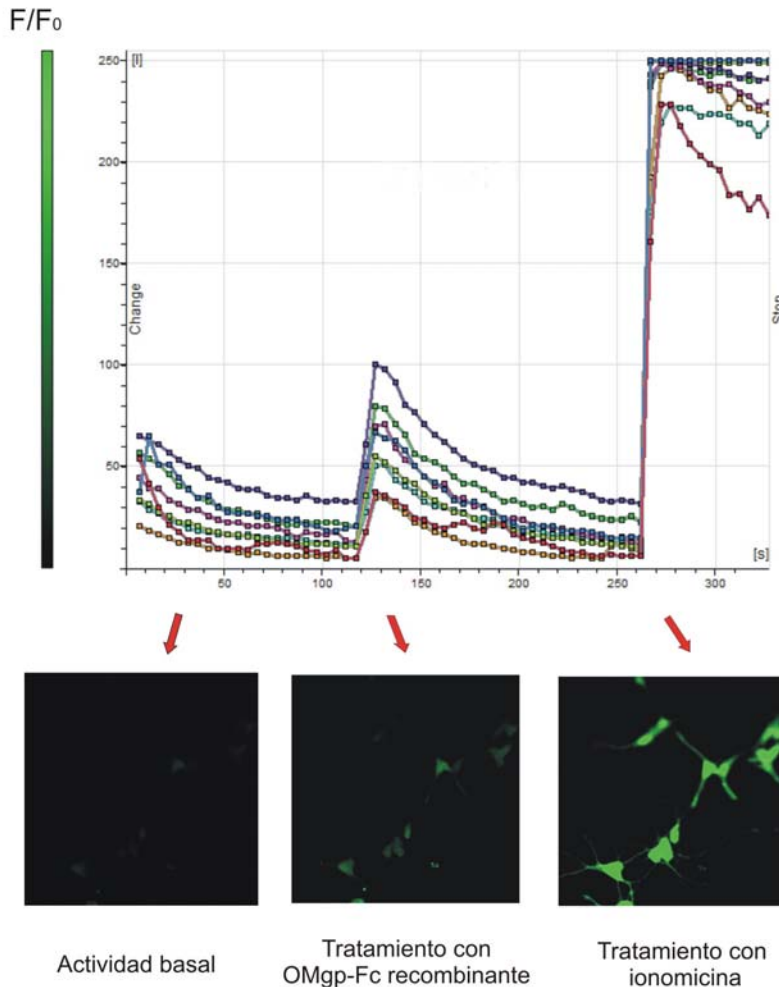


Figura 36. Medición del efecto de OMgp en la movilización del calcio intracelular de un cultivo primario de hipocampo mediante sistema de Fluo-4/AM.

Para nuestro experimento, registramos la actividad basal de 8 células durante 120 segundos. Después añadimos proteína exógena OMgp recombinante a una concentración de $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y observamos un incremento en la señal fluorescente que disminuye tras unos segundos. Por último, utilizamos como control positivo *ionomicina*, un ionóforo que abre canales de calcio extracelulares dejando entrar calcio al interior de la célula (Figura 36). Los resultados obtenidos con este experimento nos sugieren que la adición exógena de OMgp es capaz de incrementar la concentración intracelular de calcio, de forma similar a la producida por una excitación mediada por glutamato. No obstante, aunque estos resultados respaldan la posible participación de OMgp en

transmisión sináptica, son todavía muy preliminares y deberían completarse con la realización de una curva dosis-dependiente o sobre cultivos de animales deficientes en OMgp o NgR1. Además, también deberían realizarse en condiciones que discriminen si el aumento de calcio se debe a una entrada del medio extracelular o a una salida de los reservorios intracelulares.

Efecto de OMgp en la actividad espontánea de cultivos primarios de hipocampo.

Esta segunda estrategia se basa en el registro electrofisiológico de la actividad espontánea mediante el empleo de un nanodispositivo recientemente desarrollado ((Morales et al., 2008) y Aleria Biodevices) (Figura 37). Estos estudios han sido realizados por Oscar Seira, estudiante predoctoral de nuestro grupo, en colaboración con el grupo de Neuroingeniería del Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC).

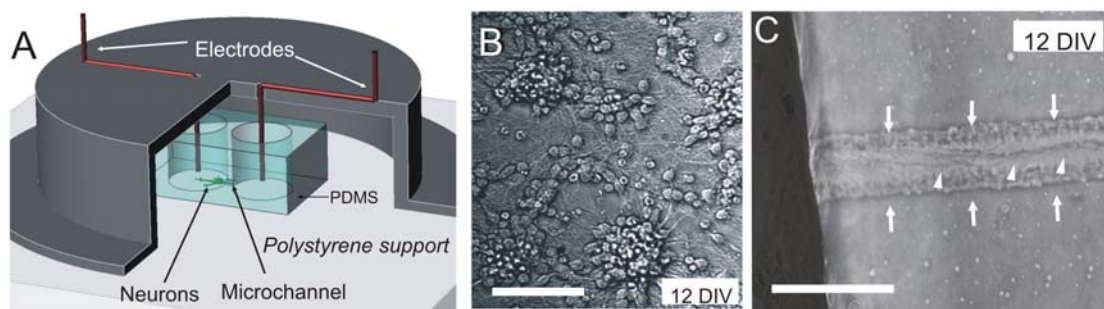


Figura 37. A) El dispositivo consiste en dos pocillos de polidimetilsiloxano (PDMS) (6 mm de diámetro), que albergan los somas neuronales, conectados entre sí mediante un microcanal ($25\ \mu\text{m} \times 3.7\ \mu\text{m} \times 1\ \text{mm}$). Las neuronas extienden sus procesos y éstos atraviesan el canal desarrollando corrientes eléctricas asociadas a actividad espontánea. El sistema de registro consiste en dos electrodos de AgCl sumergidos en el medio extracelular de ambos pocillos. Este medio contiene propiedades eléctricas y funciona como conductor formando un circuito cerrado desde un electrodo al otro a través del microcanal, con lo que se evita el empleo de micropipetas. B) Los cultivos primarios de hipocampo (E15.5) se siembran a una densidad de 60.000 a 100.000 células por pocillo y se mantienen 10-12 DIV para que las neuritas puedan atravesar el microcanal (C) y generar actividad espontánea (PPSE: potencial postsináptico excitatorio) (Morales *et al.*, 2008; Soussou *et al.*, 2007). Escalas: B, 75 y C, 100 μm .

Antes de determinar el efecto de OMgp en la actividad sináptica del cultivo, registramos la actividad basal del mismo. Esta actividad es analizada mediante el programa informático MATLAB. Para ello, sustituimos el medio de incubación de ambos pocillos por PBS 0.1 M con 0.1 % BSA (medio en el que va disuelta la proteína recombinante OMgp). Tras 5 minutos de registro, se elimina este medio y se añade la proteína OMgp recombinante (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Por último, para comprobar que la señal registrada procede de transmisión sináptica, añadimos tetrodotoxina (TTX; 1 μM) para bloquear canales sodio

sensibles a voltaje (Figura 38). Algunos dispositivos fueron tratados con NEP(1-40) a $30 \mu\text{M}$, un antagonista de NgR1, para comprobar si el efecto de OMgp en la actividad sináptica estaba mediado por NgR1.

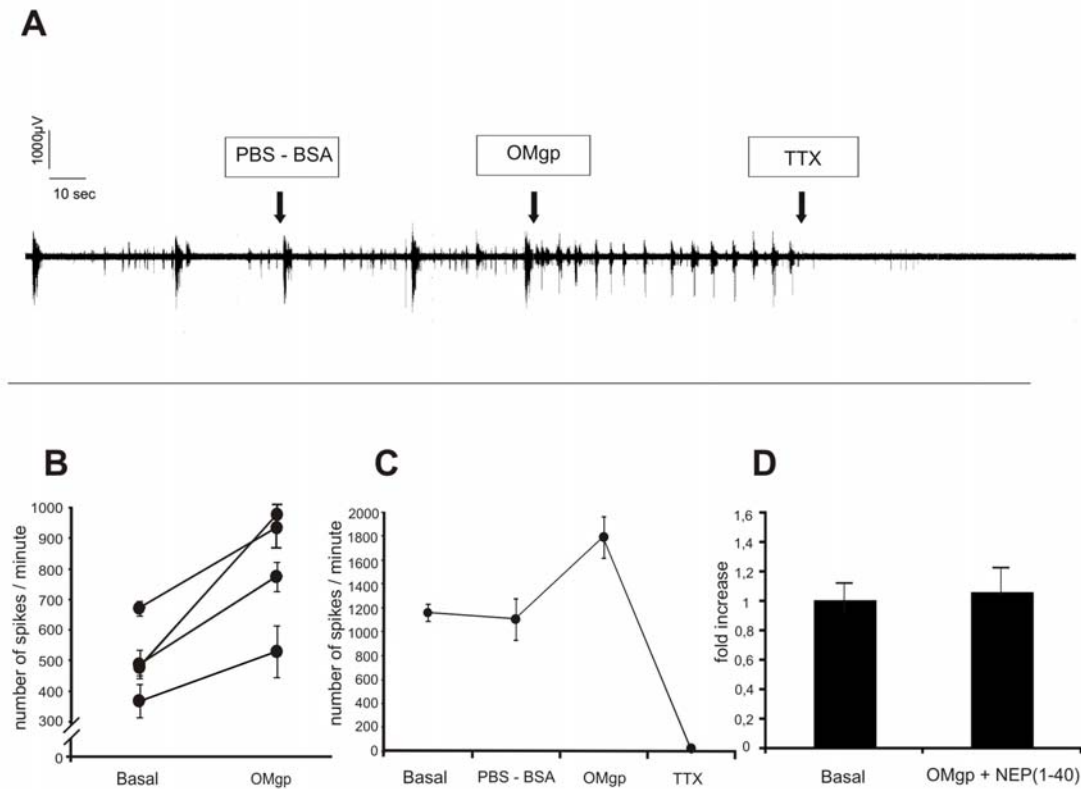


Figura 38. Efecto de OMgp en transmisión sináptica de cultivo primario de hipocampo. **A)** Representación gráfica de la actividad del cultivo en respuesta al tratamiento con PBS-BSA, OMgp recombinante y TTX. **B-D)** Histogramas que representan el número de espigas registradas por minuto en diferentes condiciones. Los valores se representan como la media del número de espigas \pm SEM. ($P \leq 0.05$, *t*-Student test).

Tras el tratamiento con la proteína OMgp recombinante, pudimos observar que la frecuencia de los PPSE (potencial postsináptico excitatorio) aumentaba considerablemente. Además, este efecto estaba mediado por NgR1, puesto que al añadir un antagonista de NgR1, NEP(1-40), la actividad se bloqueaba. No obstante, estos resultados deberían de ser confirmados mediante la realización de curva dosis-dependiente y registros de cultivos primarios de animales deficientes en OMgp o NgR1. Además, también podrían ser contrastados por registros electrofisiológicos clásicos en rebanadas de hipocampo.

Aunque los resultados obtenidos mediante estas estrategias son todavía preliminares, ambos nos sugieren la participación de OMgp en actividad sináptica.

1.5 Función de MAIPs en especificidad axonal

Uno de los datos más singulares que observamos en nuestros estudios fue el marcaje de OMgp en axones agrupados en forma de clúster en la capa IV de corteza somatosensorial en estadio P5, siendo lo más sorprendente que este marcaje aumentaba en P8 para disminuir posteriormente (Capítulo 2, Figura 3). Estos clústeres se asemejan a los barriles de la corteza somatosensorial (*barrel-field*), que son agrupaciones discretas de neuronas corticales que reciben axones del núcleo ventral posterior medio del tálamo (VPM).

Los barriles transmiten a la corteza la información sensorial táctil procedente de las vibrisas del hocico del ratón. Cada pelo envía información preferentemente a un barril determinado en el hemisferio contralateral, siguiendo una organización topográfica, aunque también envía eferencias en menor medida a otros barriles cercanos (Figura 39).

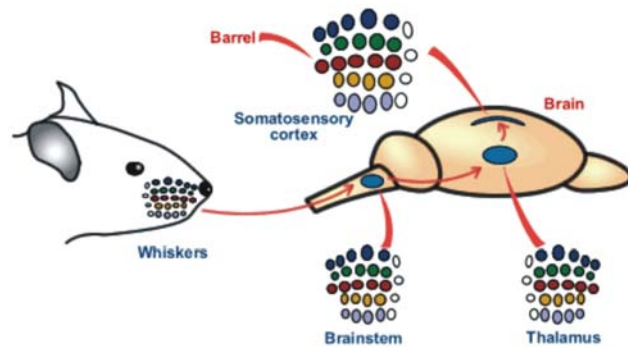


Figura 39. Representación de los pelos del hocico del ratón en la corteza somatosensorial. La disposición topográfica de los barriles de la corteza corresponde a la disposición espacial de los pelos del hocico en filas y columnas separadas, de forma que cada pelo está representado en un barril. La misma organización en campo de barriles se encuentra en el tronco encefálico y en el núcleo VPM del tálamo, lo que permite la transmisión de la información desde la cara a la corteza.

Esta organización topográfica se mantiene en todas las estaciones de relevo de la vía somatosensorial, como el complejo del trigémino del tronco cerebral y núcleo VPM del tálamo. Los barriles se forman durante un periodo crítico de la etapa postnatal y su formación es dependiente de sus aferencias talámicas (plasticidad dependiente de experiencia sensorial).

Los axones talámicos llegan a capa IV en P0, formando una banda uniforme continua y mostrando cierto grado de solapamiento, hasta que se van segregando en barriles más o menos definidos alrededor de P3. Sin embargo, para que adquieran su distribución final, en P5-P6, ha de tener lugar un proceso de refinamiento axonal que incluye la retracción

de los brotes axonales que invaden las capas II-III y la formación de nuevos colaterales (Rebsam et al., 2002) (Figura 40).

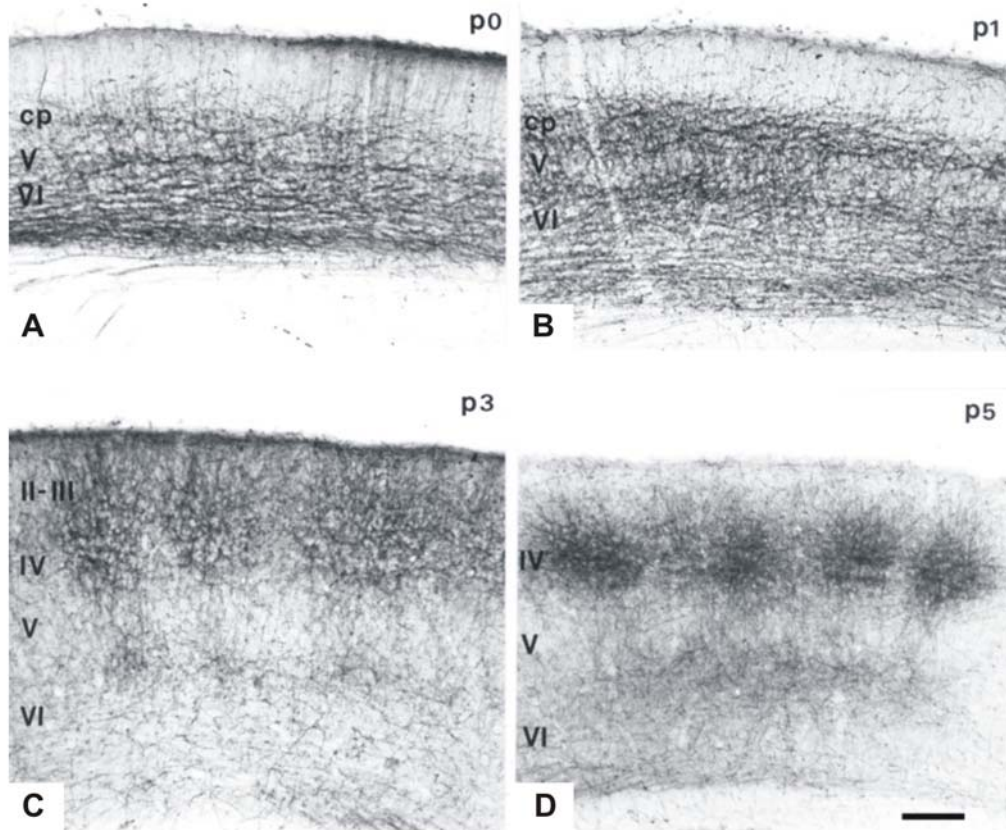


Figura 40. Refinamiento laminar y tangencial progresivo de los axones talámicos en la corteza somatosensorial. Las microfotografías muestran la distribución de los axones, marcados con 5-HTT (transportador de serotonina) a nivel del *barrel-field* en secciones coronales desde P0 (día de nacimiento) hasta P5. **A-B)** A P0-P1, los axones talámicos invaden la placa cortical formando una red densa y extensa de fibras con una orientación ligeramente tangencial. **C)** A P3, los axones talámicos empiezan a segregarse en forma de barriles tanto en las capas IV y VI, y algunos axones se extienden de forma transitoria hacia la superficie pial. **D)** A P5, los axones que invadían las capas superiores se han retraído, formando clústeres de axones bien delimitados en la capa IV. Escala: 100 µm. Adaptado de Rebsam et al., 2002.

Debido a que observamos expresión de OMgp en el momento de la segregación de los terminales talámicos en forma de barriles (Rebsam et al., 2002; Rebsam et al., 2005; Rice and Van der Loos, 1977), nos planteamos la posibilidad de que OMgp estuviera ejerciendo algún papel en el establecimiento y/o refinamiento de la conexión tálamo-cortical. Por ello, analizamos la distribución de los axones talámicos con el marcador 5-HTT (transportador de serotonina) en animales deficientes en OMgp en estadio P7 (Capítulo 2, Figura 6). Pudimos observar que los barriles estaban formados en el animal deficiente y que la estratificación cortical era correcta, incluso en el adulto, por lo que la

presencia de OMgp en axones talámicos no es esencial para su formación. Sin embargo, estos ratones mostraban una distribución alterada de axones talámicos, ya que invadían de forma ectópica las capas II-III, por lo que se puede concluir que OMgp es requerido por los axones talámicos para la correcta inervación de las neuronas corticales. Sería muy útil poder analizar la segregación de los axones talámicos a lo largo del tiempo mediante trazadores anterógrados que nos permitan visualizar las arborizaciones axonales de forma individualizada en ausencia de OMgp.

Como ya se ha mencionado, el gen *omgp* se localiza en un intrón del gen *nfl*, que codifica para Neurofibromin 1 (NF1) (ver Introducción, apartado 3.2). Los animales deficientes en NF1 muestran una correcta distribución de axones talámicos; sin embargo, ante la falta de NF1, las neuronas corticales no son capaces de agruparse para formar barriles (Lush et al., 2008). Aunque el fragmento deletado del gen *nfl* no incluye al gen *omgp*, los niveles de OMgp no han sido analizados en el mutante para NF1, por lo que no podemos descartar un efecto adicional en el fenotipo de este animal por la posible ausencia de OMgp. No obstante, los niveles de NF1 si fueron analizados en nuestro modelo animal, siendo equiparables a los niveles de animales controles y recientemente ha sido corroborado por Lee et al (Lee et al., 2009), por lo que podemos concluir que las alteraciones que observamos en nuestro estudio se deben fundamentalmente a la falta de OMgp, y no a una posible carencia de NF1.

Ante esta anómala inervación de axones talámicos en el animal mutante de OMgp, surgen diversas hipótesis. Por una parte, es razonable pensar, teniendo en cuenta su función en la inhibición del crecimiento neurítico, que OMgp pueda intervenir en la retracción de los brotes aberrantes en el proceso de segregación de los axones. Es decir, que la falta de esta proteína conlleva que los brotes no se retraigan y que permanezcan todavía en las capas II-III en un estadio de P7. En esta línea, otro laboratorio ha descrito que ratones deficientes en *omgp* muestran *sprouting* aberrante en los nodos de Ranvier, lo que implica una función en inhibición de *sprouting* aberrante en el adulto (Huang et al., 2005). Además, NgR1 está presente en neuronas corticales de capas II-III y IV (McGee et al., 2005; Wang et al., 2002c), por lo que es probable que OMgp y NgR1 puedan estar actuando en el refinamiento de la conexión. También se ha descrito que Nogo-A puede actuar como supresor del crecimiento neurítico a través de un efecto negativo en el cono de crecimiento en el SNC intacto. Su eliminación promueve la

dinámica del citoesqueleto induciendo un aumento en la motilidad del cono axonal y en el crecimiento neurítico (Mingorance-Le Meur et al., 2007; Montani et al., 2009). Por tanto, podemos plantearnos la posibilidad de que OMgp ejerza una función similar. La distribución de los barriles también ha sido estudiada en ratones deficientes en Nogo-A y NgR1 siendo normal la segregación de las neuronas corticales en los barriles (McGee et al., 2005). Sin embargo, como no se ha analizado la distribución de los axones talámicos en estos animales, no se puede descartar la participación de NgR1 en este proceso de refinamiento. Aún más, el recientemente descrito PirB, ha sido implicado en la restricción de la plasticidad cortical en la corteza visual (Syken et al., 2006), por lo que tampoco podemos descartar una acción conjunta de OMgp y PirB en la especificación de axones talámicos.

Otra hipótesis plausible es que la falta de OMgp hiciera que estos axones fueran insensibles a algún tipo de molécula señal quimiotáctica que intervenga en posicionamiento axonal, ya sea causando la atracción de axones hacia la capa IV o provocando la repulsión de las capas II-III. En este sentido, se ha descrito que la misma alteración que nosotros observamos en ratones *omgp* *-/-* también tiene lugar en ratones deficientes en TrkB (Vitalis et al., 2002), lo que hace pensar que OMgp y TrkB puedan estar actuando en la misma vía para promover el refinamiento axonal. Por tanto, estos efectos morfológicos podrían ser la consecuencia de una alteración en la vía de señalización de TrkB debido a la falta de OMgp. Por otra parte, se ha descrito que BDNF, el ligando de mayor afinidad del receptor TrkB, participa en el correcto posicionamiento de neuronas GABAérgicas en la corteza cerebral (Alcantara et al., 2006), por lo que no podemos descartar que la señalización por BDNF y TrkB participen conjuntamente con OMgp en la segregación del *barrel-field*. Por tanto, se necesitan de estudios que determinen la posible interacción entre OMgp y TrkB y la modulación en la expresión de OMgp por BDNF.

También es posible que la activación de la vía TrkB induzca la expresión de moléculas implicadas en especificación axonal tales como moléculas de adhesión. Respecto a esto, hay que recordar que OMgp pueda estar actuando como molécula de adhesión a través de su dominio LRR y de su epítipo extracelular HNK-1 (Mikol et al., 1990b). Este epítipo está presente en moléculas de adhesión bien caracterizadas como MAG, NCAM, L1, TAG-1/axonina-1 o Tenascina R ((Schachner and Martini, 1995) para

revisión). Diversos estudios indican que HNK-1 está implicado en adhesión, reconocimiento celular, migración celular y crecimiento neurítico. La elevada conservación filogenética (vertebrados, insectos y sanguijuela) es una indicación de su importancia funcional. De hecho, los ratones deficientes en HNK-1 muestran alteraciones en aprendizaje espacial y plasticidad sináptica (Yamamoto et al., 2002).

HNK-1 permite interacciones célula-célula, mediante uniones homofílicas o heterofílicas, e interacciones célula-matriz extracelular, por ejemplo con laminina o selectinas L y P (Schachner and Martini, 1995) (Figura 41). En el caso de OMgp, se ha sugerido que este epítipo pueda estar actuando en los nodos de Ranvier, permitiendo la unión oligodendrocito-oligodendrocito o neurona-oligodendrocito (Mikol et al., 1990b). Puesto que no todas las moléculas portadoras de HNK-1, expresan este epítipo al mismo tiempo, es razonable pensar que la incorporación de HNK-1 a la proteína OMgp pueda estar regulada en el tiempo y ser específica de tipo celular. Por tanto, se necesitan de estudios más detallados que discriminen el patrón de expresión espacio-temporal de HNK-1 para conocer mejor su papel en esta proteína y su posible implicación en desarrollo axonal y, en particular, en el desarrollo de la conexión tálamo-cortical.

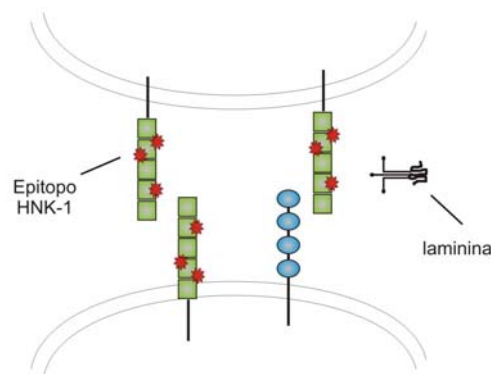


Figura 41. El epítipo HNK-1 puede establecer interacciones célula-célula, tanto homofílicas como heterofílicas, o interacciones célula-matriz extracelular.

Como conclusión, podemos afirmar que esta es la primera descripción de una función de una MAIP en la formación del *barrel-field*, ya sea a través de NgR1, TrkB, PirB u otros posibles receptores.

II. MAIPs en condiciones de neurodegeneración en el SNC

Como ya se ha mencionado, al inicio de este trabajo, algunos estudios habían descrito la implicación de algunas proteínas de la mielina, como Nogo-A, además de otros Reticulones en diversas enfermedades. Por ejemplo, se había mostrado que Nogo-A aumentaba, a nivel de ARNm y de proteína, en el hipocampo de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (Bandtlow et al., 2004) y también aumentaba en pacientes de esclerosis múltiple, tanto en cerebros (por oligodendrocitos) como en suero y fluido cerebroespinal (Reindl et al., 2003; Satoh et al., 2005). Asimismo, también se observó un aumento de Nogo-A en biopsias de músculo esquelético de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica y en el modelo animal de esta enfermedad (Dupuis et al., 2002), y un aumento de ARNm en corteza cerebral de pacientes con esquizofrenia (Novak et al., 2002). Además, también se había descrito que RTN3 y NogoB interaccionaban con la enzima β -secretasa, disminuyendo la síntesis de péptido A β (He et al., 2004). Estas evidencias llevaron a plantearnos la posibilidad de que la expresión de Nogo-A pudiera estar alterada en AD.

Al estudiar el patrón de expresión de Nogo-A en individuos controles (situación de envejecimiento normal) e individuos con AD avanzada (estadios V/VI de Braak y Braak) hemos observado ciertas similitudes entre ambos, como inmunoreactividad en sustancia blanca, en oligodendrocitos en diversos estratos, en neuronas granulares y proyección de fibras musgosas. Es de gran importancia que Nogo-A se localice en el soma de neuronas granulares, así como en sus axones, las fibras musgosas, una conexión no mielinizada en el adulto. Este hecho también ha sido descrito en hipocampos escleróticos y no escleróticos de pacientes epilépticos (Bandtlow et al., 2004).

Sin embargo, hemos observado una gran diferencia entre ambas poblaciones, como es el incremento notable de inmunoreactividad en neuronas piramidales y no piramidales, especialmente en las regiones CA3-2 en AD. Sorprendentemente, también encontramos esta diferencia en el hipocampo esclerótico de pacientes epilépticos. Además, también observamos un aumento de neuronas piramidales de CA1 positivas para Nogo-A y un incremento en la inmunoreactividad de la capa molecular interna (iml) del DG, hecho que se correlaciona con el aumento de marcaje de células musgosas.

La conexión entorrino-hipocámpica se reduce durante el envejecimiento normal, pero está particularmente afectada en AD, puesto que existe una extensa pérdida de neuronas de proyección de las capas II-III de la corteza entorrinal (CE) en los cerebros afectados por esta enfermedad (Braak et al., 2000) que a su vez causa una degeneración axonal anterógrada, es decir, provocando la muerte de sus células diana. Pero, además, la pérdida de sinapsis de la capa molecular originada por la muerte de neuronas entorrinales induce una sinaptogénesis reactiva o *sprouting* en el DG, tanto por neuronas granulares como por células musgosas, en un intento por mantener la estabilidad funcional del circuito (Cotman and Anderson, 1988). La degeneración en el DG se transmite a su población diana, las neuronas piramidales de CA3, y desde aquí a la región CA1 y así sucesivamente, afectando a todo el circuito, incluyendo también a sus aferencias y eferencias. El *sprouting* axonal y la reorganización sináptica son fenómenos que también ocurren en el hipocampo de pacientes de epilepsia temporal, en el que se observa un incremento en los niveles proteicos de Nogo-A en capa molecular del DG desde estadios tempranos no escleróticos (Bandtlow et al., 2004). Pero además, se ha descrito un rápido, aunque transitorio, incremento de la expresión de Nogo-A en células que desarrollan *sprouting* axonal en el hipocampo tras la axotomía de vía perforante (Meier et al., 2003; Mingorance et al., 2004). Según estos resultados, podemos pensar que Nogo-A esté facilitando la reinervación sináptica, aunque esto contrasta con el hecho de que el bloqueo de su función promueve el *sprouting* (Blochliger et al., 2001; Buffo et al., 2000; Emerick et al., 2003). Sin embargo, lo más factible es pensar que los niveles de Nogo-A puedan incrementar en la neurona después de que el *sprouting* haya tenido lugar en ella. Así, una sobreexpresión retardada de Nogo-A puede contribuir a la formación y estabilización de las sinapsis reactivas en AD. Otra posibilidad es que estas neuronas puedan hacer *sprouting*, a pesar de tener niveles más elevados de Nogo-A, porque disminuyen sus niveles de NgR1, lo que les haría insensibles al efecto inhibitorio de Nogo-A.

Estas diferencias en el patrón de expresión de Nogo-A también se correlacionaban con cambios en los niveles totales de proteína en extractos de cerebros de enfermos de AD y controles, observando un incremento en el contenido total de Nogo-A tanto en la formación hipocámpica (FH) como en corteza frontal en AD. También comprobamos que existía un ligero incremento en los niveles de MBP, especialmente en la FH. Como se ha indicado anteriormente, Nogo-A se expresa en neuronas, así como también en

oligodendrocitos; por el contrario MBP puede ser sobreexpresado por progenitores de oligodendrocitos reactivos y por oligodendrocitos maduros reactivos. Se ha descrito que, bajo ciertas circunstancias, una situación de desmielinización en el SNC adulto puede ser seguida por cierto grado de reparación, al menos para ciertos tractos axonales (por ej. el pedúnculo cerebelar, cuyos axones son envueltos por nuevas vainas de mielina) (Blakemore, 1973). Así, la sobreexpresión de ciertas proteínas asociadas a mielina, como MBP, podría formar parte de las respuestas de los oligodendrocitos a una disfunción axonal, encaminadas a la restauración de las vainas de mielina y a la recuperación de la función neuronal. En este sentido, ya se describió un incremento en la expresión de MBP a nivel de ARNm en AD (Macq et al., 1989) y un aumento en los niveles de MAG y MBP en oligodendrocitos tras producirse fenómenos de isquemia y lesiones en el SNC y en procesos de desmielinización en esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica (Dupuis et al., 2002; Gregersen et al., 2001; Mingorance et al., 2005; Satoh et al., 2005). Aunque hemos podido detectar un aumento de Nogo-A en neuronas del hipocampo, no podemos afirmar que también los oligodendrocitos la sobreexpresen. Aún así, podemos sugerir que un incremento en la síntesis de las proteínas de mielina (Nogo-A y MBP) en oligodendrocitos supervivientes puede constituir un intento para reparar los tractos mielínicos afectados, como sugirió Jensen que ocurría en el hipocampo tras lesión de CE (Jensen et al., 2000). Por el contrario, la sobreexpresión de Nogo-A en neuronas puede reflejar otras funciones independientes de la estabilización de la mielina o ser simplemente el resultado de la desestabilización en la red de RE y del desajuste en la homeostasis del calcio que tiene lugar en la AD (Mattson and Chan, 2003).

Recientemente, se ha descrito un nuevo papel protector de MBP en el desarrollo de la AD, puesto que esta proteína es capaz de unirse a péptidos A β e inhibir su ensamblaje fibrilar (Hoos et al., 2007; Hoos et al., 2009); pero además, el mismo laboratorio demuestra que los péptidos A β_{40} y A β_{42} son degradados *in vitro* por MBP purificada de cerebro humano a través de su actividad proteolítica endógena (Liao et al., 2009). Asimismo, demuestran que MBP puede degradar placas amiloides en animales transgénicos para APP. Según estos resultados, MBP posee una actividad eliminadora de A β *in vitro*, y aún a falta de determinar si esta actividad tiene lugar *in vivo*, podemos plantearnos la posibilidad de que la sobreexpresión de MBP que encontramos en AD

sea un proceso para favorecer la eliminación del péptido y evitar la formación de agregados amiloides.

Por otra parte, una de las observaciones más sorprendentes que encontramos en nuestro estudio fue la expresión de Nogo-A en placas neuríticas en la FH. En concreto, el 64% de las placas de la FH presentaban procesos celulares inmunoreactivos para Nogo-A (y negativos para GFAP). Sin embargo, mediante experimentos de coimmunoprecipitación de extractos de cerebros con AD, observamos que Nogo-A no interaccionaba ni con APP ni con el péptido A β , lo que indicaba que no hay interacción física entre ellos. Estos datos encajan con un estudio que describe que Nogo-A está presente en las inmediaciones de los depósitos de A β en ratones transgénicos portadores de la mutación APP-Swedish (Prinjha *et al.*, 2003, Soc. Neurosci. Abstract). Los mismos autores afirman que la sobreexpresión de Nogo-A aumenta la producción de A β *in vitro* en células SHSY5Y que expresan APP, por lo que no podemos descartar que haya una interacción indirecta entre ellos. Una posible explicación a este fenómeno es que Nogo-A sea la causa del *sprouting* aberrante inefectivo observado alrededor de las placas. Por otra parte, estudios recientes han sugerido una función de Nogo-A y NgR1 en estas placas neuríticas. En estos estudios se ha demostrado que NgR1 se expresa en macrófagos de nervios periféricos lesionados y en microglía/macrófagos activados del SNC y que la acción de NgR1 permite el movimiento y la eliminación de estas células fagocíticas al final del proceso de la degeneración walleriana (David *et al.*, 2008; Fry *et al.*, 2007) (Figura 42).



Figura 42. Ilustración que muestra la respuesta de macrófagos a la lesión en nervio periférico. El macrófago (m) entra dentro de la lámina basal de la célula de Schwann (sc) durante la primera fase de la degeneración walleriana para fagocitar los axones y la mielina dañada (md). Los macrófagos, todavía dentro de la lámina basal de la célula de Schwann, muestran el último paso de la degradación de la mielina (vesículas blancas) y empieza a expresar NgR1 (círculos azules) en su superficie. En la última etapa, cuando el axón se ha regenerado, las células de Schwann expresan proteínas de mielina y entre ellas a los ligandos de NgR1 (línea roja). Las interacciones entre NgR1 en el macrófago y sus ligandos en la célula de Schwann induce la activación de RhoA en el macrófago, lo que conlleva la repulsión del macrófago y su migración fuera de la lamina basal de la célula de Schwann. *Adaptado de David et al., 2008.*

Dado que la expresión de NgR1 por macrófagos activados es una característica común en distintas alteraciones como lesión de nervios periféricos, lesión de nervio ciático y esclerosis múltiple, es bastante probable, aunque todavía no se ha demostrado, que ocurra lo mismo en AD. Así, estos autores proponen que, NgR1, presente en macrófagos/microglía activada, podría interactuar con el material Nogo-A positivo presente en las placas amiloides, lo que podría causar la repulsión de los procesos citoplasmáticos de la microglía activada reduciendo la eficiencia de ésta para “limpiar” los depósitos. Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados obtenidos de la infusión intraventricular de NgR1 en su forma soluble (Park et al., 2006a), ya que éste podría asociarse a Nogo-A, impidiendo la interacción de Nogo-A con NgR1 de la microglía y evitando que ésta sea repelida de las placas, lo que permitiría una efectiva fagocitosis de los depósitos. De forma análoga, también se ha sugerido este papel de Nogo-A y NgR1 en neuroinflamación en esclerosis múltiple. Se ha descrito que en esta enfermedad, NgR1, Lingo-1 y TROY se sobreexpresan en astrocitos reactivos y microglía/macrófagos activos y Nogo-A se sobreexpresa en oligodendrocitos (Sato et al., 2005; Sato et al., 2007), por lo que se ha llegado a proponer un modelo por el cual los macrófagos interactúan con oligodendrocitos a través del complejo Nogo receptor, lo que causaría la repulsión de macrófagos del tejido intacto y limitando por tanto la dispersión de la respuesta inflamatoria (David et al., 2008).

Nuestros resultados abren nuevas cuestiones como, por ejemplo, la posibilidad de que la expresión de Nogo-A esté modulada por A β o su posible participación en los efectos neurotóxicos de A β . Un estudio de He *et al.* describió que todos los miembros RTN interactúan con BACE1 (enzima β -secretasa que genera el péptido A β), secuestrándola e impidiendo la formación de péptido A β (He et al., 2004). Dado que todos los RTN son capaces de unirse a BACE1, lo más probable es que esta interacción tenga lugar a través del dominio RHD, común para todos los miembros. En concreto, este estudio se focaliza en la interacción entre RTN3/Nogo-B y BACE1 y describe una disminución de A β cuando ambos son sobreexpresados (He et al., 2004). Sin embargo, aunque esta interacción tiene lugar de forma fisiológica en cerebros humanos y ambas moléculas colocalizan en el RE y aparato de Golgi de neuronas corticales, la distribución y los niveles de expresión de RTN3 no están alterados en AD (Kume et al., 2009). Puesto que algunos miembros de la familia RTN desarrollan importantes funciones en el tráfico vesicular de proteínas desde el RE hasta otros compartimentos

intracelulares como el complejo de Golgi y endosomas (Iwahashi et al., 2002; Oertle and Schwab, 2003) y, aunque se desconoce la importancia biológica de esta interacción, se ha sugerido que los RTN podrían estar regulando el tráfico celular de BACE1 entre el RE y el aparato de Golgi (He et al., 2004). Por otra parte, otros estudios muestran que RTN3 se acumula en neuritas distróficas, pero no en placas amiloides, y que la acumulación de RTN3 induce la formación de neuritas distróficas contribuyendo así a la patogénesis de la AD (Hu et al., 2007).

Además también se ha descrito que NgR1 interfiere en el procesamiento de APP, limitando el acceso de las enzimas α y β -secretasas a APP, e impidiendo por tanto, la formación de péptidos A β , lo que confiere un papel neuroprotector a NgR1 (Park et al., 2006a). Además, el mismo laboratorio ha demostrado que la infusión intracerebroventricular y la inyección subcutánea del fragmento soluble de NgR1 (NgR(310)ecto-Fc) acelera la eliminación del péptido A β , reduciendo el número de placas y mejorando las tareas de aprendizaje en ratones con avanzados síntomas de la enfermedad (Park et al., 2006a; Park et al., 2006b). No obstante, existen discrepancias en cuanto a la localización de NgR1 en placas amiloides. Mientras que Park observa NgR1 en placas amiloides, el estudio llevado a cabo por Zhu encuentra NgR1 en el 60 % de los ovillos neurofibrilares analizados en pacientes de AD pero no en placas (Zhu et al., 2007).

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo para identificar moléculas capaces de formar complejos fisiológicos con la proteína APP en el cerebro de ratón, se ha descrito que Lingo-1 interacciona con APP (Bai et al., 2008). Los autores demuestran que una disminución en la expresión de Lingo-1 *in vitro* se correlaciona con una disminución de los niveles del péptido A β , por lo que proponen que Lingo-1 estaría facilitando el acceso de BACE1 a APP y promovería la generación de péptidos A β . Por tanto, el efecto de Lingo-1 en la producción de A β sería contrario al ejercido por NgR1. No obstante, aunque los patrones de expresión de ARNm para Lingo-1 y APP se solapan, respaldando la idea de la interacción entre ellos, aún no se ha comprobado si esta interacción tiene lugar en extractos de cerebros de enfermos. Aún así, estas evidencias sugieren que Lingo-1 puede ser una importante diana terapéutica en AD, a pesar de que aún está por determinar si existen otros mecanismos indirectos por los cuales Lingo-1 esté facilitando la vía amiloidogénica, como por ejemplo, inhibiendo la actividad α -

secretasa o estabilizando el complejo APP-BACE1. En nuestro laboratorio, hemos analizado los niveles de expresión de Lingo-1 y OMgp en extractos de cerebros controles y de AD, y no hemos encontrado ninguna diferencia entre ellos (Figura 43). Es posible que no detectemos aumento de OMgp en AD, en el supuesto de que se sobreexpresen en oligodendrocitos para reparar las envueltas miélicas, porque la fracción de OMgp neuronal es mayor que la fracción de OMgp oligodendroglial y ésta podría quedar enmascarada.

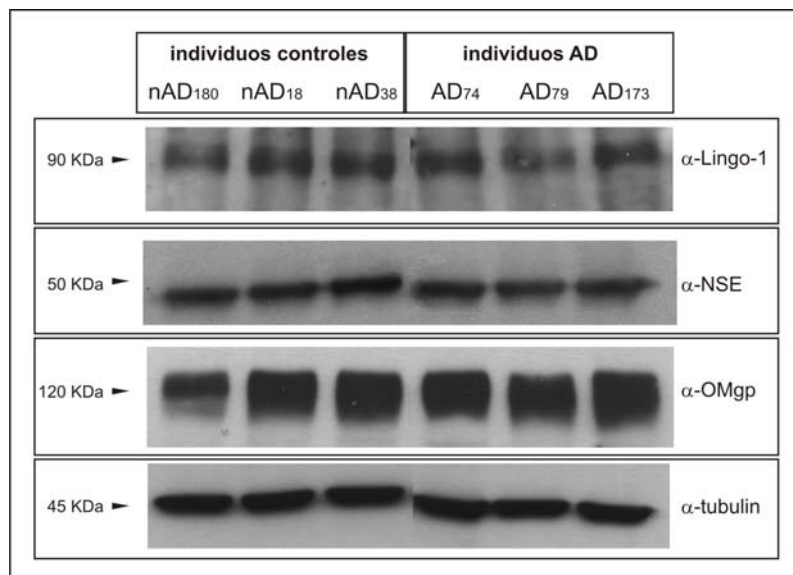


Figura 43. Niveles de expresión de OMgp y Lingo-1 en la formación hipocámpica de individuos controles (nAD) y enfermos de AD. Se utilizaron anticuerpos anti-tubulina y anti-NSE (enolasa específica neuronal) para estandarizar el contenido total de proteínas.

Pero además, también se ha descrito una nueva interacción para APP con la molécula LRRTM3, que al igual que Lingo-1 y NgR1 contiene diversos dominios LRR y muestra una gran similitud de secuencia con estos últimos (Majercak et al., 2006). Sin embargo, Lingo-1 y LRRTM3 muestran un patrón de expresión opuesto en el hipocampo. Mientras que Lingo-1 y APP se expresan intensamente en las regiones CA1-CA3 y menos en el DG, la expresión de LRRTM3 es más pronunciada en neuronas del DG pero modesta en neuronas piramidales. A pesar de estas diferencias en su expresión, tanto Lingo-1 como LRRTM3 afectan de forma similar al procesamiento de APP *in*

vitro. En definitiva, se requieren estudios más detallados que aclaren la promiscuidad en la unión de APP a moléculas con dominios LRR como NgR1, Lingo-1 y LRRTM3.

Lingo-1 también ha sido implicado en otros procesos neurodegenerativos, además de AD, como enfermedad de Parkinson o enfermedades desmielinizantes, sugiriendo el uso de inhibidores de Lingo-1 como nuevas y prometedoras drogas neuroprotectoras (Bai et al., 2008; Inoue et al., 2007a; Mi et al., 2007). Su implicación ha sido testada en neuronas dopaminérgicas, células ganglionares de retina y neuronas de cerebelo. Por ejemplo, se ha demostrado que la inhibición de Lingo-1, mediante diferentes estrategias, aumenta los niveles de EGFR y Akt fosforilado protegiendo a neuronas dopaminérgicas de una neurodegeneración inducida en un modelo experimental de enfermedad de Parkinson y promoviendo también su crecimiento neurítico. Además, también se ha visto que los pacientes tienen niveles aumentados de Lingo-1 en la *substantia nigra*, lo que implicaría que Lingo-1 puede estar promoviendo la degeneración en esta enfermedad. En consecuencia, se ha propuesto que Lingo-1, de forma normal, recluta a EGFR regulando negativamente la vía de señalización EGFR/Akt y de forma independiente a NgR1/inhibidores de mielina. Por el contrario, la inhibición de Lingo-1 aumentaría los niveles de EGFR favoreciendo la supervivencia neuronal (Inoue et al., 2007a; Mi et al., 2008). Este efecto neurodegenerativo también se ha observado en neuronas cerebelares (Zhao et al., 2008) y células ganglionares de retina en un modelo crónico de glaucoma en rata (Fu et al., 2008). Además, los mismos autores mostraron que el tratamiento combinado de BDNF y antagonistas de Lingo-1 proporcionan protección a largo plazo para estas neuronas, lo que nos vuelve a sugerir una relación entre las vías de señalización de BDNF y Lingo-1 (Fu et al., 2009).

También ha sido estudiada la función de Lingo-1 en un contexto de desmielinización, como es el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental en rata (EAE, del inglés *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) (Mi et al., 2007; Mi et al., 2009). En él se ha visto que la pérdida de función de Lingo-1, en el animal deficiente para Lingo-1 o mediante tratamientos bloqueantes de su función, disminuye los síntomas de la enfermedad, mejora la integridad axonal y favorece la mielinización al promover la diferenciación de precursores en oligodendrocitos mielinizantes maduros. Por el contrario, la sobreexpresión de Lingo-1 conlleva la inhibición de la diferenciación oligodendroglial y de la mielinización, por lo que el bloqueo de su función representa

un potencial terapéutico para promover la remielinización en esclerosis múltiple (para revisión (Mi et al., 2008; Rudick et al., 2008)).

En cuanto a ALS (del inglés *amyotrophic lateral sclerosis*), existen diversos estudios que correlacionan a MAIPs con esta enfermedad y, de hecho, se ha sugerido que Nogo-A pueda servir como marcador molecular de la enfermedad en estadios presintomáticos (Pradat et al., 2007). La primera evidencia de esta relación fue la observación de un aumento de Nogo-A en biopsias de músculo esquelético y muestras *post mortem* de pacientes con ALS y en el modelo animal de esta enfermedad (Dupuis et al., 2002). Esto fue corroborado al mostrar que la eliminación de Nogo-A en un modelo animal de ALS reducía la denervación del músculo y prolongaba la supervivencia, mientras que la sobreexpresión de Nogo-A en animales controles desestabilizaba los terminales de nervios motores y promovía la denervación. Esto sugería que el aumento de Nogo-A podía causar la repulsión y desestabilización de los terminales nerviosos y, en último término, la muerte de motoneuronas (Jokic et al., 2006). Un estudio reciente ha descrito un incremento transitorio en la expresión de Nogo-A y NgR1 en motoneuronas en un modelo animal para ALS y sugieren que puede representar una reacción de supervivencia inducida por estrés (Miyazaki et al., 2009). Otro estudio sorprendente revela que la unión de NgR1 a péptidos derivados de Nogo-66, tanto agonistas como antagonistas, previene la muerte dependiente de p75^{NTR} tras la estimulación con NGF, en motoneuronas embrionarias en cultivo (Dupuis et al., 2008). Además, también confiere protección a motoneuronas de médula espinal tras axotomía neonatal de nervio ciático. Estos hallazgos demuestran una función hasta ahora desconocida de NgR1 en supervivencia neuronal que puede ser relevante par el desarrollo y degeneración de motoneuronas.

En conjunto, todos estos datos apoyan la hipótesis de que Nogo-A, y el resto de MAIPs, pueden tener diferentes funciones, como es la participación en supervivencia neuronal, el remodelado o estabilización sináptica y crecimiento neurítico, además de aquéllas asociados con la formación y estabilización de las vainas de mielina y a la inhibición de la regeneración axonal en el adulto.

CONCLUSIONES

1. Las proteínas Lingo-1 y OMgp se expresan ampliamente en todo el SNC de ratón, desde estadios tempranos de embriogénesis, y su expresión se incrementa a lo largo del desarrollo postnatal.
2. Lingo-1 y OMgp se expresan en la mayoría de poblaciones neuronales y, de forma específica, en diversas subpoblaciones de interneuronas del hipocampo propio.
3. La coexistencia de Lingo-1, NgR1, p75 y TROY en el cerebro de ratón tiene lugar durante una ventana temporal postnatal muy definida, desde P5 hasta el adulto.
4. El dominio intracelular de Lingo-1 no es necesario para la formación del complejo receptor, pero es indispensable para su correcta señalización. Además, este dominio interacciona con la proteína neuronal Myt11.
5. OMgp es necesario para la correcta distribución de los axones tálamo-corticales en el campo de barriles de la corteza somatosensorial. Su deficiencia en animales de expresión nula conlleva alteraciones en el desarrollo de dicha conexión.
6. A nivel celular, OMgp se localiza en terminales presinápticos, tanto en el desarrollo como en la etapa adulta. No descartamos la posibilidad de que OMgp pueda generar transientes de calcio intracelular mediados por NgR1 u otros receptores.
7. En el hipocampo humano, Nogo-A se expresa en neuronas piramidales y de circuito local, así como en oligodendrocitos. En el giro dentado, es expresado en neuronas granulares del giro dentado y sus axones de proyección, lo que sugiere una posible función no relacionada con mielina.
8. En la enfermedad de Alzheimer, el patrón de expresión de Nogo-A es similar al observado durante el envejecimiento normal. Sin embargo se observa un incremento de la expresión de Nogo-A en neuronas piramidales de la región CA3-2 del hipocampo y de la corteza frontal. Nogo-A se localiza, de forma relevante, en placas neuríticas, con alto contenido en péptido A β , y envueltas por astrocitos reactivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcantara, S., Pozas, E., Ibanez, C.F., Soriano, E., 2006. BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization. *Cereb Cortex*. 16, 487-99.
- Aloy, E.M., Weinmann, O., Pot, C., Kasper, H., Dodd, D.A., Rulicke, T., Rossi, F., Schwab, M.E., 2006. Synaptic destabilization by neuronal Nogo-A. *Brain Cell Biol*. 35, 137-56.
- Amaral, D.G., Dolorfo, C., Alvarez-Royo, P., 1991. Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus*. 1, 415-35.
- Amaral, D.G., Witter, M.P., 1995. Hippocampal formation. In: *The rat nervous system*, Paxinos, G., ed., Academic Press. New York pp: 443-494.
- Amaral, D.G., Scharfman, H.E., Lavenex, P., 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*. 163, 3-22.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., Rubenstein, J.L., 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science*. 278, 474-6.
- Angevine, J.B., Jr., Sidman, R.L., 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*. 192, 766-8.
- Aroca, P., Lorente-Canovas, B., Mateos, F.R., Puelles, L., 2006. Locus coeruleus neurons originate in alar rhombomere 1 and migrate into the basal plate: Studies in chick and mouse embryos. *J Comp Neurol*. 496, 802-18.
- Atwal, J.K., Pinkston-Gosse, J., Syken, J., Stawicki, S., Wu, Y., Shatz, C., Tessier-Lavigne, M., 2008. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science*. 322, 967-70.
- Bai, Y., Markham, K., Chen, F., Weerasekera, R., Watts, J., Horne, P., Wakutani, Y., Bagshaw, R., Mathews, P.M., Fraser, P.E., Westaway, D., St George-Hyslop, P., Schmitt-Ulms, G., 2008. The in vivo brain interactome of the amyloid precursor protein. *Mol Cell Proteomics*. 7, 15-34.
- Bandtlow, C.E., Schwab, M.E., 2000. NI-35/250/nogo-a: a neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. *Glia*. 29, 175-81.
- Bandtlow, C.E., Dlaska, M., Pirker, S., Czech, T., Baumgartner, C., Sperk, G., 2004. Increased expression of Nogo-A in hippocampal neurons of patients with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci*. 20, 195-206.
- Barker, P.A., 2004. p75^{NTR} is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*. 42, 529-33.
- Barrette, B., Vallieres, N., Dube, M., Lacroix, S., 2007. Expression profile of receptors for myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the intact and injured mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci*. 34, 519-38.
- Barton, W.A., Liu, B.P., Tzvetkova, D., Jeffrey, P.D., Fournier, A.E., Sah, D., Cate, R., Strittmatter, S.M., Nikolov, D.B., 2003. Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *Embo J*. 22, 3291-302.
- Bartzokis, G., 2004. Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 25, 5-18; author reply 49-62.
- Bellefroid, E.J., Bourguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D.J., Kintner, C., Pieler, T., 1996. X-MyT1, a *Xenopus* C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell*. 87, 1191-202.

- Benson, M.D., Romero, M.I., Lush, M.E., Lu, Q.R., Henkemeyer, M., Parada, L.F., 2005. Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 10694-9.
- Berger, T.W., 1984. Long-term potentiation of hippocampal synaptic transmission affects rate of behavioral learning. *Science.* 224, 627-30.
- Blackstad, T.W., 1956. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol.* 105, 417-537.
- Blakemore, W.F., 1973. Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. *J Neurol Sci.* 20, 73-83.
- Blennow, K., de Leon, M.J., Zetterberg, H., 2006. Alzheimer's disease. *Lancet.* 368, 387-403.
- Blochlinger, S., Weinmann, O., Schwab, M.E., Thalhammer, M., 2001. Neuronal plasticity and formation of new synaptic contacts follow pyramidal lesions and neutralization of Nogo-A: a light and electron microscopic study in the pontine nuclei of adult rats. *J Comp Neurol.* 433, 426-36.
- Bovolenta, P., Feraud-Espinosa, I., 2000. Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol.* 61, 113-32.
- Braak, H., Braak, E., 1996. Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis. *Acta Neuropathol.* 92, 197-201.
- Braak, H., Del Tredici, K., Schultz, C., Braak, E., 2000. Vulnerability of select neuronal types to Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 924, 53-61.
- Bregman, B.S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H.N., Gao, D., Schwab, M.E., 1995. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature.* 378, 498-501.
- Buffo, A., Zagrebelsky, M., Huber, A.B., Skerra, A., Schwab, M.E., Strata, P., Rossi, F., 2000. Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured purkinje cell axons. *J Neurosci.* 20, 2275-86.
- Bundesen, L.Q., Scheel, T.A., Bregman, B.S., Kromer, L.F., 2003. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J Neurosci.* 23, 7789-800.
- Busch, S.A., Silver, J., 2007. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 17, 120-7.
- Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B.S., Filbin, M.T., 2001. Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci.* 21, 4731-9.
- Caltharp, S.A., Pira, C.U., Mishima, N., Youngdale, E.N., McNeill, D.S., Liwnicz, B.H., Oberg, K.C., 2007. NOGO-A induction and localization during chick brain development indicate a role disparate from neurite outgrowth inhibition. *BMC Dev Biol.* 7, 32.
- Carim-Todd, L., Escarceller, M., Estivill, X., Sumoy, L., 2003. LRRN6A/LERN1 (leucine-rich repeat neuronal protein 1), a novel gene with enriched expression in limbic system and neocortex. *Eur J Neurosci.* 18, 3167-82.
- Caroni, P., Schwab, M.E., 1988a. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron.* 1, 85-96.

- Caroni, P., Schwab, M.E., 1988b. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol.* 106, 1281-8.
- Cobas, A., Fairen, A., 1988. GABAergic neurons of different morphological classes are cogenerated in the mouse barrel cortex. *J Neurocytol.* 17, 511-9.
- Cotman, C.W., Anderson, K.J., 1988. Synaptic plasticity and functional stabilization in the hippocampal formation: possible role in Alzheimer's disease. *Adv Neurol.* 47, 313-35.
- Cremisi, F., Philpott, A., Ohnuma, S., 2003. Cell cycle and cell fate interactions in neural development. *Curr Opin Neurobiol.* 13, 26-33.
- Chao, M.V., 1994. The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol.* 25, 1373-85.
- Chen, M.S., Huber, A.B., van der Haar, M.E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A.A., Christ, F., Schwab, M.E., 2000. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature.* 403, 434-9.
- Chen, Y., Aulia, S., Li, L., Tang, B.L., 2006a. AMIGO and friends: an emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs. *Brain Res Rev.* 51, 265-74.
- Chen, Y., Tang, X., Cao, X., Chen, H., Zhang, X., 2006b. Human Nogo-C overexpression induces HEK293 cell apoptosis via a mechanism that involves JNK-c-Jun pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 348, 923-8.
- Chen, Y., Zeng, J., Cen, L., Chen, Y., Wang, X., Yao, G., Wang, W., Qi, W., Kong, K., 2009. Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. *J Int Med Res.* 37, 281-8.
- Chenn, A., McConnell, S.K., 1995. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell.* 82, 631-41.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J.L., Ben-Ari, Y., 1991. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* 14, 515-9.
- Chivatakarn, O., Kaneko, S., He, Z., Tessier-Lavigne, M., Giger, R.J., 2007. The Nogo-66 receptor NgR1 is required only for the acute growth cone-collapsing but not the chronic growth-inhibitory actions of myelin inhibitors. *J Neurosci.* 27, 7117-24.
- David, S., Lacroix, S., 2003. Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu Rev Neurosci.* 26, 411-40.
- David, S., Fry, E.J., Lopez-Vales, R., 2008. Novel roles for Nogo receptor in inflammation and disease. *Trends Neurosci.* 31, 221-6.
- de Carlos, J.A., Lopez-Mascaraque, L., Valverde, F., 1996. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci.* 16, 6146-56.
- de Lanerolle, N.C., Lee, T.S., 2005. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 7, 190-203.
- Devor, M., Govrin-Lippmann, R., 1979. Maturation of axonal sprouts after nerve crush. *Exp Neurol.* 64, 260-70.
- Dodd, D.A., Niederoest, B., Bloechlinger, S., Dupuis, L., Loeffler, J.P., Schwab, M.E., 2005. Nogo-A, -B, and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *J Biol Chem.* 280, 12494-502.
- Domeniconi, M., Cao, Z., Spencer, T., Sivasankaran, R., Wang, K., Nikulina, E., Kimura, N., Cai, H., Deng, K., Gao, Y., He, Z., Filbin, M., 2002. Myelin-

- associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*. 35, 283-90.
- Dou, C.L., Levine, J.M., 1994. Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci*. 14, 7616-28.
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Pradat, P.F., Lacomblez, L., Seihlan, D., Prinjha, R., Walsh, F.S., Meininger, V., Loeffler, J.P., 2002. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 10, 358-65.
- Dupuis, L., Pehar, M., Cassina, P., Rene, F., Castellanos, R., Rouaux, C., Gandelman, M., Dimou, L., Schwab, M.E., Loeffler, J.P., Barbeito, L., Gonzalez de Aguilar, J.L., 2008. Nogo receptor antagonizes p75NTR-dependent motor neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 740-5.
- Eby, M.T., Jasmin, A., Kumar, A., Sharma, K., Chaudhary, P.M., 2000. TAJ, a novel member of the tumor necrosis factor receptor family, activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and mediates caspase-independent cell death. *J Biol Chem*. 275, 15336-42.
- Edwards, M.A., Caviness, V.S., Jr., Schneider, G.E., 1986. Development of cell and fiber lamination in the mouse superior colliculus. *J Comp Neurol*. 248, 395-409.
- Elger, C.E., Schmidt, D., 2008. Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy Behav*. 12, 501-39.
- Elias, L.A., Wang, D.D., Kriegstein, A.R., 2007. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*. 448, 901-7.
- Emerick, A.J., Neafsey, E.J., Schwab, M.E., Kartje, G.L., 2003. Functional reorganization of the motor cortex in adult rats after cortical lesion and treatment with monoclonal antibody IN-1. *J Neurosci*. 23, 4826-30.
- Engel, J., Jr., 1996. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 26, 141-50.
- Fairen, A., De Felipe, J., Regidor, J., 1984. Cellular components of the cerebral cortex. In: *Cerebral cortex*. Peters, A., Jones, E.G. eds., Plenum Press. New York. 521-53.
- Fairen, A., Cobas, A., Fonseca, M., 1986. Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex. *J Comp Neurol*. 251, 67-83.
- Fawcett, J.W., Asher, R.A., 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*. 49, 377-91.
- Filbin, M.T., 1996. The muddle with MAG. *Mol Cell Neurosci*. 8, 84-92.
- Fournier, A.E., GrandPre, T., Strittmatter, S.M., 2001. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*. 409, 341-6.
- Fournier, A.E., Gould, G.C., Liu, B.P., Strittmatter, S.M., 2002. Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci*. 22, 8876-83.
- Freund, T.F., Buzsaki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 6, 347-470.
- Freund, T.F., 2003. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci*. 26, 489-95.
- Fry, E.J., Ho, C., David, S., 2007. A role for Nogo receptor in macrophage clearance from injured peripheral nerve. *Neuron*. 53, 649-62.
- Fu, Q.L., Hu, B., Wu, W., Pepinsky, R.B., Mi, S., So, K.F., 2008. Blocking LINGO-1 function promotes retinal ganglion cell survival following ocular hypertension and optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49, 975-85.

- Fu, Q.L., Li, X., Yip, H.K., Shao, Z., Wu, W., Mi, S., So, K.F., 2009. Combined effect of brain-derived neurotrophic factor and LINGO-1 fusion protein on long-term survival of retinal ganglion cells in chronic glaucoma. *Neuroscience*. 162, 375-82.
- Funahashi, S., Hasegawa, T., Nagano, A., Sato, K., 2008. Differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo receptors and their ligands in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 506, 141-60.
- Gao, Y., Wang, B., Xiao, Z., Chen, B., Han, J., Wang, X., Zhang, J.J., Gao, S., Zhao, Y., Dai, J., 2009. Nogo-66 regulates Nanog expression through Stat3 pathway in murine embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*.
- Garcia-Moreno, F., Lopez-Mascaraque, L., De Carlos, J.A., 2007. Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J Comp Neurol*. 500, 419-32.
- Gilbert, S.F., 2006. *Developmental biology*. 8th ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Gilthorpe, J.D., Papantoniou, E.K., Chedotal, A., Lumsden, A., Wingate, R.J., 2002. The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Development*. 129, 4719-28.
- Glennner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 120, 885-90.
- GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T., Strittmatter, S.M., 2000. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature*. 403, 439-44.
- Gregersen, R., Christensen, T., Lehrmann, E., Diemer, N.H., Finsen, B., 2001. Focal cerebral ischemia induces increased myelin basic protein and growth-associated protein-43 gene transcription in peri-infarct areas in the rat brain. *Exp Brain Res*. 138, 384-92.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., Wisniewski, H.M., 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*. 261, 6084-9.
- Grunewald, E., Kinnell, H.L., Porteous, D.J., Thomson, P.A., 2009. GPR50 interacts with neuronal NOGO-A and affects neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*.
- Gruss, H.J., Dower, S.K., 1995. The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines Mol Ther*. 1, 75-105.
- Habib, A.A., Gulcher, J.R., Hognason, T., Zheng, L., Stefansson, K., 1998a. The OMgp gene, a second growth suppressor within the NF1 gene. *Oncogene*. 16, 1525-31.
- Habib, A.A., Marton, L.S., Allwardt, B., Gulcher, J.R., Mikol, D.D., Hognason, T., Chattopadhyay, N., Stefansson, K., 1998b. Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system. *J Neurochem*. 70, 1704-11.
- Hagino, S., Iseki, K., Mori, T., Zhang, Y., Hikake, T., Yokoya, S., Takeuchi, M., Hasimoto, H., Kikuchi, S., Wanaka, A., 2003. Slit and glypican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. *Glia*. 42, 130-8.
- Hardy, J., 2009. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem*. 110, 1129-34.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 256, 184-5.
- Hatten, M.E., 1999. Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci*. 22, 511-39.
- Hatten, M.E., 2002. New directions in neuronal migration. *Science*. 297, 1660-3.

- He, W., Lu, Y., Qahwash, I., Hu, X.Y., Chang, A., Yan, R., 2004. Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation. *Nat Med.* 10, 959-65.
- He, Z., Koprivica, V., 2004. The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annu Rev Neurosci.* 27, 341-68.
- Hisaoka, T., Morikawa, Y., Kitamura, T., Senba, E., 2003. Expression of a member of tumor necrosis factor receptor superfamily, TROY, in the developing mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 143, 105-9.
- Hisaoka, T., Morikawa, Y., Senba, E., 2006. Characterization of TROY/TNFRSF19/TAJ-expressing cells in the adult mouse forebrain. *Brain Res.* 1110, 81-94.
- Hoos, M.D., Ahmed, M., Smith, S.O., Van Nostrand, W.E., 2007. Inhibition of familial cerebral amyloid angiopathy mutant amyloid beta-protein fibril assembly by myelin basic protein. *J Biol Chem.* 282, 9952-61.
- Hoos, M.D., Ahmed, M., Smith, S.O., Van Nostrand, W.E., 2009. Myelin basic protein binds to and inhibits the fibrillar assembly of Abeta42 in vitro. *Biochemistry.* 48, 4720-7.
- Horner, P.J., Gage, F.H., 2000. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature.* 407, 963-70.
- Hu, F., Strittmatter, S.M., 2008. The N-terminal domain of Nogo-A inhibits cell adhesion and axonal outgrowth by an integrin-specific mechanism. *J Neurosci.* 28, 1262-9.
- Hu, W.H., Hausmann, O.N., Yan, M.S., Walters, W.M., Wong, P.K., Bethea, J.R., 2002. Identification and characterization of a novel Nogo-interacting mitochondrial protein (NIMP). *J Neurochem.* 81, 36-45.
- Hu, X., Shi, Q., Zhou, X., He, W., Yi, H., Yin, X., Gearing, M., Levey, A., Yan, R., 2007. Transgenic mice overexpressing reticulon 3 develop neuritic abnormalities. *Embo J.* 26, 2755-67.
- Huang, J.K., Phillips, G.R., Roth, A.D., Pedraza, L., Shan, W., Belkaid, W., Mi, S., Fex-Svenningsen, A., Florens, L., Yates, J.R., 3rd, Colman, D.R., 2005. Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth. *Science.* 310, 1813-7.
- Huang, Z.J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M.F., Maffei, L., Tonegawa, S., 1999. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell.* 98, 739-55.
- Huber, A.B., Weinmann, O., Brosamle, C., Oertle, T., Schwab, M.E., 2002. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci.* 22, 3553-67.
- Hunt, D., Coffin, R.S., Anderson, P.N., 2002a. The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review. *J Neurocytol.* 31, 93-120.
- Hunt, D., Mason, M.R., Campbell, G., Coffin, R., Anderson, P.N., 2002b. Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons. *Mol Cell Neurosci.* 20, 537-52.
- Inoue, H., Lin, L., Lee, X., Shao, Z., Mendes, S., Snodgrass-Belt, P., Sweigard, H., Engber, T., Pepinsky, B., Yang, L., Beal, M.F., Mi, S., Isacson, O., 2007a. Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 14430-5.
- Inoue, M., Kato, K., Matsushashi, H., Kizuka, Y., Kawasaki, T., Oka, S., 2007b. Distributions of glucuronyltransferases, GlcAT-P and GlcAT-S, and their target

- substrate, the HNK-1 carbohydrate epitope in the adult mouse brain with or without a targeted deletion of the GlcAT-P gene. *Brain Res.* 1179, 1-15.
- Iwahashi, J., Kawasaki, I., Kohara, Y., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Ohshima, Y., Hamada, N., Hara, K., Kashiwagi, T., Toyoda, T., 2002. *Caenorhabditis elegans* reticulon interacts with RME-1 during embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 293, 698-704.
- Jensen, M.B., Poulsen, F.R., Finsen, B., 2000. Axonal sprouting regulates myelin basic protein gene expression in denervated mouse hippocampus. *Int J Dev Neurosci.* 18, 221-35.
- Ji, B., Li, M., Wu, W.T., Yick, L.W., Lee, X., Shao, Z., Wang, J., So, K.F., McCoy, J.M., Pepinsky, R.B., Mi, S., Relton, J.K., 2006. LINGO-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci.* 33, 311-20.
- Johnson, M.R., DeClue, J.E., Felzmann, S., Vass, W.C., Xu, G., White, R., Lowy, D.R., 1994. Neurofibromin can inhibit Ras-dependent growth by a mechanism independent of its GTPase-accelerating function. *Mol Cell Biol.* 14, 641-5.
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J.L., Dimou, L., Lin, S., Fergani, A., Ruegg, M.A., Schwab, M.E., Dupuis, L., Loeffler, J.P., 2006. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep.* 7, 1162-7.
- Jones, E.G., 2009. The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human. *Cereb Cortex.* 19, 1953-6.
- Josephson, A., Widenfalk, J., Widmer, H.W., Olson, L., Spenger, C., 2001. NOGO mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Exp Neurol.* 169, 319-28.
- Josephson, A., Trifunovski, A., Widmer, H.R., Widenfalk, J., Olson, L., Spenger, C., 2002. Nogo-receptor gene activity: cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. *J Comp Neurol.* 453, 292-304.
- Josephson, A., Trifunovski, A., Scheele, C., Widenfalk, J., Wahlestedt, C., Brene, S., Olson, L., Spenger, C., 2003. Activity-induced and developmental downregulation of the Nogo receptor. *Cell Tissue Res.* 311, 333-42.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jesell, T.M., 2000. *Principles of Neuroscience* 4th ed. McGraw-Hill. New York
- Kerr, K.M., Agster, K.L., Furtak, S.C., Burwell, R.D., 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus.* 17, 697-708.
- Kim, J.E., Li, S., GrandPre, T., Qiu, D., Strittmatter, S.M., 2003. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron.* 38, 187-99.
- Kim, J.G., Hudson, L.D., 1992. Novel member of the zinc finger superfamily: A C2-HC finger that recognizes a glia-specific gene. *Mol Cell Biol.* 12, 5632-9.
- Kim, J.G., Armstrong, R.C., v Agoston, D., Robinsky, A., Wiese, C., Nagle, J., Hudson, L.D., 1997. Myelin transcription factor 1 (Myt1) of the oligodendrocyte lineage, along with a closely related CCHC zinc finger, is expressed in developing neurons in the mammalian central nervous system. *J Neurosci Res.* 50, 272-90.
- Knecht, A.K., Bronner-Fraser, M., 2002. Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet.* 3, 453-61.
- Kobe, B., Kajava, A.V., 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 11, 725-32.

- Kojima, T., Morikawa, Y., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Senba, E., Kitamura, T., 2000. TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J Biol Chem.* 275, 20742-7.
- Komuro, H., Yacubova, E., Yacubova, E., Rakic, P., 2001. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci.* 21, 527-40.
- Kottis, V., Thibault, P., Mikol, D., Xiao, Z.C., Zhang, R., Dergham, P., Braun, P.E., 2002. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurochem.* 82, 1566-9.
- Kullander, K., Croll, S.D., Zimmer, M., Pan, L., McClain, J., Hughes, V., Zabski, S., DeChiara, T.M., Klein, R., Yancopoulos, G.D., Gale, N.W., 2001. Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control. *Genes Dev.* 15, 877-88.
- Kume, H., Konishi, Y., Murayama, K.S., Kametani, F., Araki, W., 2009. Expression of reticulon 3 in Alzheimer's disease brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 35, 178-88.
- Kwok, J.C., Afshari, F., Garcia-Alias, G., Fawcett, J.W., 2008. Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restor Neurol Neurosci.* 26, 131-45.
- LaFerla, F.M., Oddo, S., 2005. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med.* 11, 170-6.
- Lee, H., Raiker, S.J., Venkatesh, K., Geary, R., Robak, L.A., Zhang, Y., Yeh, H.H., Shrager, P., Giger, R.J., 2008. Synaptic function for the Nogo-66 receptor NgR1: regulation of dendritic spine morphology and activity-dependent synaptic strength. *J Neurosci.* 28, 2753-65.
- Lee, J.K., Case, L.C., Chan, A.F., Zhu, Y., Tessier-Lavigne, M., Zheng, B., 2009. Generation of an OMgp allelic series in mice. *Genesis.*
- Lee, X., Yang, Z., Shao, Z., Rosenberg, S.S., Levesque, M., Pepinsky, R.B., Qiu, M., Miller, R.H., Chan, J.R., Mi, S., 2007. NGF regulates the expression of axonal LINGO-1 to inhibit oligodendrocyte differentiation and myelination. *J Neurosci.* 27, 220-5.
- Letinic, K., Zoncu, R., Rakic, P., 2002. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature.* 417, 645-9.
- Li, Q., Qi, B., Oka, K., Shimakage, M., Yoshioka, N., Inoue, H., Hakura, A., Kodama, K., Stanbridge, E.J., Yutsudo, M., 2001. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. *Oncogene.* 20, 3929-36.
- Liao, M.C., Ahmed, M., Smith, S.O., Van Nostrand, W.E., 2009. Degradation of amyloid beta protein by purified myelin basic protein. *J Biol Chem.* 284, 28917-25.
- Liu, X., Wang, Y., Zhang, Y., Zhu, W., Xu, X., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Lu, C., He, C., 2009. Nogo-A inhibits necln-accelerated neurite outgrowth by retaining necln in the cytoplasm. *Mol Cell Neurosci.* 41, 51-61.
- Liu, Y.Y., Jin, W.L., Liu, H.L., Ju, G., 2003. Electron microscopic localization of Nogo-A at the postsynaptic active zone of the rat. *Neurosci Lett.* 346, 153-6.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A., 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.* 264, 1145-8.
- Lorente de Nó, R., 1933. Studies on the structure of the cerebral cortex. *J Psychol Neurol.* 45, 381-438.

- Lorente de Nó, R., 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol.* 46, 113-177.
- Lush, M.E., Li, Y., Kwon, C.H., Chen, J., Parada, L.F., 2008. Neurofibromin is required for barrel formation in the mouse somatosensory cortex. *J Neurosci.* 28, 1580-7.
- Lynch, G., Muller, D., Seubert, P., Larson, J., 1988. Long-term potentiation: persisting problems and recent results. *Brain Res Bull.* 21, 363-72.
- Macq, A.F., Goossens, F., Maloteaux, J.M., Octave, J.N., 1989. Overexpression of the myelin basic protein RNA in the cortex of a patient with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Belg.* 89, 316.
- Magloczky, Z., Freund, T.F., 2005. Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci.* 28, 334-40.
- Majercak, J., Ray, W.J., Espeseth, A., Simon, A., Shi, X.P., Wolffe, C., Getty, K., Marine, S., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Bartz, S., Gates, A., Xu, M., Huang, Q., Ma, L., Shughrue, P., Burchard, J., Colussi, D., Pietrak, B., Kahana, J., Beher, D., Rosahl, T., Shearman, M., Hazuda, D., Sachs, A.B., Koblan, K.S., Seabrook, G.R., Stone, D.J., 2006. LRRTM3 promotes processing of amyloid-precursor protein by BACE1 and is a positional candidate gene for late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 17967-72.
- Malatesta, P., Hartfuss, E., Gotz, M., 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development.* 127, 5253-63.
- Malatesta, P., Appolloni, I., Calzolari, F., 2008. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res.* 331, 165-78.
- Marin, O., 2002. [Origin of cortical interneurons: basic concepts and clinical implications]. *Rev Neurol.* 35, 743-51.
- Marin, O., Rubenstein, J.L., 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci.* 26, 441-83.
- Marin, O., Valdeolillos, M., Moya, F., 2006. Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends Neurosci.* 29, 655-61.
- Martin, I., Andres, C.R., Veldrine, S., Tabagh, R., Michelle, C., Jourdan, M.L., Heuze-Vourc'h, N., Corcia, P., Duittoz, A., Vourc'h, P., 2009. Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells. *Brain Res.* 1284, 22-30.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G., 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 23, 649-711.
- Martini, F.J., Valiente, M., Lopez Bendito, G., Szabo, G., Moya, F., Valdeolillos, M., Marin, O., 2009. Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development.* 136, 41-50.
- Mattson, M.P., Chan, S.L., 2003. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 34, 385-97.
- Mattson, M.P., 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430, 631-9.
- Matyas, F., Freund, T.F., Gulyas, A.I., 2004a. Convergence of excitatory and inhibitory inputs onto CCK-containing basket cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 19, 1243-56.
- Matyas, F., Freund, T.F., Gulyas, A.I., 2004b. Immunocytochemically defined interneuron populations in the hippocampus of mouse strains used in transgenic technology. *Hippocampus.* 14, 460-81.
- McBain, C.J., Fisahn, A., 2001. Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci.* 2, 11-23.

- McGee, A.W., Yang, Y., Fischer, Q.S., Daw, N.W., Strittmatter, S.M., 2005. Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science*. 309, 2222-6.
- McKerracher, L., David, S., Jackson, D.L., Kottis, V., Dunn, R.J., Braun, P.E., 1994. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*. 13, 805-11.
- Meier, S., Brauer, A.U., Heimrich, B., Schwab, M.E., Nitsch, R., Savaskan, N.E., 2003. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. *Faseb J*. 17, 1153-5.
- Meiners, S., Powell, E.M., Geller, H.M., 1995. A distinct subset of tenascin/CS-6-PG-rich astrocytes restricts neuronal growth in vitro. *J Neurosci*. 15, 8096-108.
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., Crowell, T., Cate, R.L., McCoy, J.M., Pepinsky, R.B., 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*. 7, 221-8.
- Mi, S., Miller, R.H., Lee, X., Scott, M.L., Shulag-Morskaya, S., Shao, Z., Chang, J., Thill, G., Levesque, M., Zhang, M., Hession, C., Sah, D., Trapp, B., He, Z., Jung, V., McCoy, J.M., Pepinsky, R.B., 2005. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci*. 8, 745-51.
- Mi, S., Hu, B., Hahm, K., Luo, Y., Kam Hui, E.S., Yuan, Q., Wong, W.M., Wang, L., Su, H., Chu, T.H., Guo, J., Zhang, W., So, K.F., Pepinsky, B., Shao, Z., Graff, C., Garber, E., Jung, V., Wu, E.X., Wu, W., 2007. LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 13, 1228-33.
- Mi, S., 2008. Troy/Taj and its role in CNS axon regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 19, 245-51.
- Mi, S., Sandrock, A., Miller, R.H., 2008. LINGO-1 and its role in CNS repair. *Int J Biochem Cell Biol*. 40, 1971-8.
- Mi, S., Miller, R.H., Tang, W., Lee, X., Hu, B., Wu, W., Zhang, Y., Shields, C.B., Zhang, Y., Miklasz, S., Shea, D., Mason, J., Franklin, R.J., Ji, B., Shao, Z., Chedotal, A., Bernard, F., Roulois, A., Xu, J., Jung, V., Pepinsky, B., 2009. Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Ann Neurol*. 65, 304-15.
- Mikol, D.D., Stefansson, K., 1988. A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes. *J Cell Biol*. 106, 1273-9.
- Mikol, D.D., Alexakos, M.J., Bayley, C.A., Lemons, R.S., Le Beau, M.M., Stefansson, K., 1990a. Structure and chromosomal localization of the gene for the oligodendrocyte-myelin glycoprotein. *J Cell Biol*. 111, 2673-9.
- Mikol, D.D., Gulcher, J.R., Stefansson, K., 1990b. The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. *J Cell Biol*. 110, 471-9.
- Mingorance-Le Meur, A., Zheng, B., Soriano, E., del Rio, J.A., 2007. Involvement of the myelin-associated inhibitor Nogo-A in early cortical development and neuronal maturation. *Cereb Cortex*. 17, 2375-86.
- Mingorance, A., Fontana, X., Sole, M., Burgaya, F., Urena, J.M., Teng, F.Y., Tang, B.L., Hunt, D., Anderson, P.N., Bethea, J.R., Schwab, M.E., Soriano, E., del Rio, J.A., 2004. Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Mol Cell Neurosci*. 26, 34-49.

- Mingorance, A., Fontana, X., Soriano, E., Del Rio, J.A., 2005. Overexpression of myelin-associated glycoprotein after axotomy of the perforant pathway. *Mol Cell Neurosci.* 29, 471-83.
- Miyazaki, K., Nagai, M., Ohta, Y., Morimoto, N., Kurata, T., Murakami, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Kamiya, T., Abe, K., 2009. Changes of Nogo-A and receptor NgR in the lumbar spinal cord of ALS model mice. *Neurol Res.* 31, 316-21.
- Monnier, P.P., Sierra, A., Schwab, J.M., Henke-Fahle, S., Mueller, B.K., 2003. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci.* 22, 319-30.
- Montani, L., Gerrits, B., Gehrig, P., Kempf, A., Dimou, L., Wollscheid, B., Schwab, M.E., 2009. Neuronal Nogo-A modulates growth cone motility via Rho-GTP/LIMK1/cofilin in the unlesioned adult nervous system. *J Biol Chem.* 284, 10793-807.
- Morales, R., Riss, M., Wang, L., Gavin, R., Del Rio, J., Alcubilla, R., Claverol-Tinture, E., 2008. Integrating multi-unit extracellular electrophysiology and plastic culture dishes for network neuroscience. *Lab on a chip.* In press.
- Moreau-Fauvarque, C., Kumanogoh, A., Camand, E., Jaillard, C., Barbin, G., Boquet, I., Love, C., Jones, E.Y., Kikutani, H., Lubetzki, C., Dusart, I., Chedotal, A., 2003. The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J Neurosci.* 23, 9229-39.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 297, 681-3.
- Mosyak, L., Wood, A., Dwyer, B., Buddha, M., Johnson, M., Aulabaugh, A., Zhong, X., Presman, E., Benard, S., Kelleher, K., Wilhelm, J., Stahl, M.L., Kriz, R., Gao, Y., Cao, Z., Ling, H.P., Pangalos, M.N., Walsh, F.S., Somers, W.S., 2006. The structure of the Lingo-1 ectodomain, a module implicated in central nervous system repair inhibition. *J Biol Chem.* 281, 36378-90.
- Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F.S., Crocker, P.R., Filbin, M.T., 1994. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron.* 13, 757-67.
- Nakajima, K., 2007. Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurochem Int.* 51, 121-31.
- Nie, D.Y., Zhou, Z.H., Ang, B.T., Teng, F.Y., Xu, G., Xiang, T., Wang, C.Y., Zeng, L., Takeda, Y., Xu, T.L., Ng, Y.K., Faivre-Sarrailh, C., Popko, B., Ling, E.A., Schachner, M., Watanabe, K., Pallen, C.J., Tang, B.L., Xiao, Z.C., 2003. Nogo-A at CNS paranodes is a ligand of Caspr: possible regulation of K(+) channel localization. *Embo J.* 22, 5666-78.
- Nie, D.Y., Ma, Q.H., Law, J.W., Chia, C.P., Dhingra, N.K., Shimoda, Y., Yang, W.L., Gong, N., Chen, Q.W., Xu, G., Hu, Q.D., Chow, P.K., Ng, Y.K., Ling, E.A., Watanabe, K., Xu, T.L., Habib, A.A., Schachner, M., Xiao, Z.C., 2006. Oligodendrocytes regulate formation of nodes of Ranvier via the recognition molecule OMgp. *Neuron Glia Biol.* 2, 151-164.
- Nielsen, J.A., Berndt, J.A., Hudson, L.D., Armstrong, R.C., 2004. Myelin transcription factor 1 (Myt1) modulates the proliferation and differentiation of oligodendrocyte lineage cells. *Mol Cell Neurosci.* 25, 111-23.
- Nobrega-Pereira, S., Marin, O., 2009. Transcriptional control of neuronal migration in the developing mouse brain. *Cereb Cortex.* 19 Suppl 1, i107-13.

- Novak, G., Kim, D., Seeman, P., Talerico, T., 2002. Schizophrenia and Nogo: elevated mRNA in cortex, and high prevalence of a homozygous CAA insert. *Brain Res Mol Brain Res.* 107, 183-9.
- Nowakowski, R.S., Rakic, P., 1981. The site of origin and route and rate of migration of neurons to the hippocampal region of the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 196, 129-54.
- O'Donnell, M., Chance, R.K., Bashaw, G.J., 2009. Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. *Annu Rev Neurosci.* 32, 383-412.
- O'Keefe, J., Conway, D.H., 1978. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res.* 31, 573-90.
- O'Keefe, J., Speakman, A., 1987. Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Exp Brain Res.* 68, 1-27.
- Oertle, T., Schwab, M.E., 2003. Nogo and its paRTNers. *Trends Cell Biol.* 13, 187-94.
- Oertle, T., van der Haar, M.E., Bandtlow, C.E., Robeva, A., Burfeind, P., Buss, A., Huber, A.B., Simonen, M., Schnell, L., Brosamle, C., Kaupmann, K., Vallon, R., Schwab, M.E., 2003. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci.* 23, 5393-406.
- Okazaki, M.M., Molnar, P., Nadler, J.V., 1999. Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth. *J Neurophysiol.* 81, 1645-60.
- Park, J.B., Yiu, G., Kaneko, S., Wang, J., Chang, J., He, X.L., Garcia, K.C., He, Z., 2005. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron.* 45, 345-51.
- Park, J.H., Gimbel, D.A., GrandPre, T., Lee, J.K., Kim, J.E., Li, W., Lee, D.H., Strittmatter, S.M., 2006a. Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *J Neurosci.* 26, 1386-95.
- Park, J.H., Widi, G.A., Gimbel, D.A., Harel, N.Y., Lee, D.H., Strittmatter, S.M., 2006b. Subcutaneous Nogo receptor removes brain amyloid-beta and improves spatial memory in Alzheimer's transgenic mice. *J Neurosci.* 26, 13279-86.
- Parnavelas, J.G., 2000. The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci.* 23, 126-31.
- Pasterkamp, R.J., Giger, R.J., Ruitenbergh, M.J., Holtmaat, A.J., De Wit, J., De Winter, F., Verhaagen, J., 1999. Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol Cell Neurosci.* 13, 143-66.
- Pasterkamp, R.J., Verhaagen, J., 2001. Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res Brain Res Rev.* 35, 36-54.
- Pasterkamp, R.J., Giger, R.J., 2009. Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 19, 263-74.
- Pedraza, L., Frey, A.B., Hempstead, B.L., Colman, D.R., Salzer, J.L., 1991. Differential expression of MAG isoforms during development. *J Neurosci Res.* 29, 141-8.
- Peters, A., Jones, E.G., 1984. *Cerebral Cortex*. Vol. 1, ed. ^eds. Plenum Press, New York.
- Pettit, D.L., Augustine, G.J., 2000. Distribution of functional glutamate and GABA receptors on hippocampal pyramidal cells and interneurons. *J Neurophysiol.* 84, 28-38.

- Pignot, V., Hein, A.E., Barske, C., Wiessner, C., Walmsley, A.R., Kaupmann, K., Mayeur, H., Sommer, B., Mir, A.K., Frentzel, S., 2003. Characterization of two novel proteins, NgRH1 and NgRH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *J Neurochem.* 85, 717-28.
- Pla, R., Borrell, V., Flames, N., Marin, O., 2006. Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J Neurosci.* 26, 6924-34.
- Pradat, P.F., Bruneteau, G., Gonzalez de Aguilar, J.L., Dupuis, L., Jokic, N., Salachas, F., Le Forestier, N., Echaniz-Laguna, A., Dubourg, O., Hauw, J.J., Tranchant, C., Loeffler, J.P., Meininger, V., 2007. Muscle Nogo-A expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. *Ann Neurol.* 62, 15-20.
- Prinjha, R., Moore, S.E., Vinson, M., Blake, S., Morrow, R., Christie, G., Michalovich, D., Simmons, D.L., Walsh, F.S., 2000. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature.* 403, 383-4.
- Purves, D., Augustine, G.A., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2001. *Neuroscience*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Qin, H., Pu, H.X., Li, M., Ahmed, S., Song, J., 2008. Identification and structural mechanism for a novel interaction between a ubiquitin ligase WWP1 and Nogo-A, a key inhibitor for central nervous system regeneration. *Biochemistry.* 47, 13647-58.
- Quarles, R.H., 2009. A hypothesis about the relationship of myelin-associated glycoprotein's function in myelinated axons to its capacity to inhibit neurite outgrowth. *Neurochem Res.* 34, 79-86.
- Raisman, G., 1969. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res.* 14, 25-48.
- Rakic, P., 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 145, 61-83.
- Rakic, P., 1974. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science.* 183, 425-7.
- Rakic, P., 2003. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex.* 13, 541-9.
- Rakic, P., 2007. The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res Rev.* 55, 204-19.
- Ramon y Cajal, S., 1911. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vestrebes*. Paris. Maloine.
- Rebsam, A., Seif, I., Gaspar, P., 2002. Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice. *J Neurosci.* 22, 8541-52.
- Rebsam, A., Seif, I., Gaspar, P., 2005. Dissociating barrel development and lesion-induced plasticity in the mouse somatosensory cortex. *J Neurosci.* 25, 706-10.
- Reindl, M., Khantane, S., Ehling, R., Schanda, K., Lutterotti, A., Brinkhoff, C., Oertle, T., Schwab, M.E., Deisenhammer, F., Berger, T., Bandtlow, C.E., 2003. Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders. *J Neuroimmunol.* 145, 139-47.
- Ribak, C.E., Vaughn, J.E., Saito, K., 1978. Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 140, 315-32.
- Rice, F.L., Van der Loos, H., 1977. Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse. *J Comp Neurol.* 171, 545-60.

- Richard, M., Giannetti, N., Saucier, D., Sacquet, J., Jourdan, F., Pellier-Monnin, V., 2005. Neuronal expression of Nogo-A mRNA and protein during neurite outgrowth in the developing rat olfactory system. *Eur J Neurosci.* 22, 2145-58.
- Rolls, A., Shechter, R., Schwartz, M., 2009. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci.* 10, 235-41.
- Roux, P.P., Barker, P.A., 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 67, 203-33.
- Rudick, R.A., Mi, S., Sandrock, A.W., Jr., 2008. LINGO-1 antagonists as therapy for multiple sclerosis: in vitro and in vivo evidence. *Expert Opin Biol Ther.* 8, 1561-70.
- Rutherford, L.C., DeWan, A., Lauer, H.M., Turrigiano, G.G., 1997. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci.* 17, 4527-35.
- Ryder, E.F., Cepko, C.L., 1994. Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron.* 12, 1011-28.
- Sandvig, A., Berry, M., Barrett, L.B., Butt, A., Logan, A., 2004. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia.* 46, 225-51.
- Satoh, J., Onoue, H., Arima, K., Yamamura, T., 2005. Nogo-A and nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64, 129-38.
- Satoh, J., Tabunoki, H., Yamamura, T., Arima, K., Konno, H., 2007. TROY and LINGO-1 expression in astrocytes and macrophages/microglia in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 33, 99-107.
- Schachner, M., Martini, R., 1995. Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci.* 18, 183-91.
- Schachner, M., Bartsch, U., 2000. Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia.* 29, 154-65.
- Schecterson, L.C., Bothwell, M., 2008. An all-purpose tool for axon guidance. *Sci Signal.* 1, pe50.
- Schmechel, D.E., Rakic, P., 1979. A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol (Berl).* 156, 115-52.
- Schnell, L., Schwab, M.E., 1990. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature.* 343, 269-72.
- Schwab, M.E., Thoenen, H., 1985. Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci.* 5, 2415-23.
- Segal, M., Olds, J., 1972. Behavior of units in hippocampal circuit of the rat during learning. *J Neurophysiol.* 35, 680-90.
- Seress, L., Ribak, C.E., 1984. Direct commissural connections to the basket cells of the hippocampal dentate gyrus: anatomical evidence for feed-forward inhibition. *J Neurocytol.* 13, 215-25.
- Shao, Z., Browning, J.L., Lee, X., Scott, M.L., Shulga-Morskaya, S., Allaire, N., Thill, G., Levesque, M., Sah, D., McCoy, J.M., Murray, B., Jung, V., Pepinsky, R.B., Mi, S., 2005. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron.* 45, 353-9.

- Sharma, A.K., Reams, R.Y., Jordan, W.H., Miller, M.A., Thacker, H.L., Snyder, P.W., 2007. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol.* 35, 984-99.
- Shearer, M.C., Niclou, S.P., Brown, D., Asher, R.A., Holtmaat, A.J., Levine, J.M., Verhaagen, J., Fawcett, J.W., 2003. The astrocyte/meningeal cell interface is a barrier to neurite outgrowth which can be overcome by manipulation of inhibitory molecules or axonal signalling pathways. *Mol Cell Neurosci.* 24, 913-25.
- Shen, Y., Tenney, A.P., Busch, S.A., Horn, K.P., Cuascut, F.X., Liu, K., He, Z., Silver, J., Flanagan, J.G., 2009. PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science.* 326, 592-6.
- Silver, J., Miller, J.H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 5, 146-56.
- Simonen, M., Pedersen, V., Weinmann, O., Schnell, L., Buss, A., Ledermann, B., Christ, F., Sansig, G., van der Putten, H., Schwab, M.E., 2003. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron.* 38, 201-11.
- Sloviter, R.S., 1992. Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neurosci Lett.* 137, 91-6.
- Sloviter, R.S., 2005. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *C R Biol.* 328, 143-53.
- Sofroniew, M.V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.*
- Song, X.Y., Zhong, J.H., Wang, X., Zhou, X.F., 2004. Suppression of p75NTR does not promote regeneration of injured spinal cord in mice. *J Neurosci.* 24, 542-6.
- Soussou, W.V., Yoon, G.J., Brinton, R.D., Berger, T.W., 2007. Neuronal network morphology and electrophysiology of hippocampal neurons cultured on surface-treated multielectrode arrays. *IEEE Trans Biomed Eng.* 54, 1309-20.
- Squire, L.R., 1987. The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol.* 21-22, 218-22.
- Steiner, P., Kulangara, K., Sarria, J.C., Glauser, L., Regazzi, R., Hirling, H., 2004. Reticulon 1-C/neuroendocrine-specific protein-C interacts with SNARE proteins. *J Neurochem.* 89, 569-80.
- Stoeckli, E., Zou, Y., 2009. How are neurons wired to form functional and plastic circuits? Meeting on Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity. *EMBO Rep.* 10, 326-30.
- Su, Z., Cao, L., Zhu, Y., Liu, X., Huang, Z., Huang, A., He, C., 2007. Nogo enhances the adhesion of olfactory ensheathing cells and inhibits their migration. *J Cell Sci.* 120, 1877-87.
- Sumiyoshi, K., Obayashi, S., Tabunoki, H., Arima, K., Satoh, J.I., 2009. Protein microarray analysis identifies cyclic nucleotide phosphodiesterase as an interactor of Nogo-A. *Neuropathology.*
- Syken, J., Grandpre, T., Kanold, P.O., Shatz, C.J., 2006. PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science.* 313, 1795-800.
- Tagami, S., Eguchi, Y., Kinoshita, M., Takeda, M., Tsujimoto, Y., 2000. A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene.* 19, 5736-46.
- Taketomi, M., Kinoshita, N., Kimura, K., Kitada, M., Noda, T., Asou, H., Nakamura, T., Ide, C., 2002. Nogo-A expression in mature oligodendrocytes of rat spinal cord in association with specific molecules. *Neurosci Lett.* 332, 37-40.

- Takiguchi-Hayashi, K., Sekiguchi, M., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Hasegawa, H., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Nakanishi, S., Tanabe, Y., 2004. Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J Neurosci.* 24, 2286-95.
- Tang, B.L., 2003. Inhibitors of neuronal regeneration: mediators and signaling mechanisms. *Neurochem Int.* 42, 189-203.
- Tang, X., Davies, J.E., Davies, S.J., 2003. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J Neurosci Res.* 71, 427-44.
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science.* 274, 1123-33.
- Thallmair, M., Metz, G.A., Z'Graggen, W.J., Raineteau, O., Kartje, G.L., Schwab, M.E., 1998. Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat Neurosci.* 1, 124-31.
- Tozaki, H., Kawasaki, T., Takagi, Y., Hirata, T., 2002. Expression of Nogo protein by growing axons in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res.* 104, 111-9.
- Trapp, B.D., 1990. Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann N Y Acad Sci.* 605, 29-43.
- Trifunovski, A., Josephson, A., Ringman, A., Brene, S., Spenger, C., Olson, L., 2004. Neuronal activity-induced regulation of Lingo-1. *Neuroreport.* 15, 2397-400.
- Tropak, M.B., Johnson, P.W., Dunn, R.J., Roder, J.C., 1988. Differential splicing of MAG transcripts during CNS and PNS development. *Brain Res.* 464, 143-55.
- Trovo-Marqui, A.B., Tajara, E.H., 2006. Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet.* 70, 1-13.
- Underwood, C.K., Coulson, E.J., 2008. The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 40, 1664-8.
- van Groen, T., Miettinen, P., Kadish, I., 2003. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus.* 13, 133-49.
- Venkatesh, K., Chivatakarn, O., Lee, H., Joshi, P.S., Kantor, D.B., Newman, B.A., Mage, R., Rader, C., Giger, R.J., 2005. The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci.* 25, 808-22.
- Venkatesh, K., Chivatakarn, O., Sheu, S.S., Giger, R.J., 2007. Molecular dissection of the myelin-associated glycoprotein receptor complex reveals cell type-specific mechanisms for neurite outgrowth inhibition. *J Cell Biol.* 177, 393-9.
- Vitalis, T., Cases, O., Gillies, K., Hanoun, N., Hamon, M., Seif, I., Gaspar, P., Kind, P., Price, D.J., 2002. Interactions between TrkB signaling and serotonin excess in the developing murine somatosensory cortex: a role in tangential and radial organization of thalamocortical axons. *J Neurosci.* 22, 4987-5000.
- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., Rapoport, T.A., 2006. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell.* 124, 573-86.
- Vourc'h, P., Dessay, S., Mbarek, O., Marouillat Vedrine, S., Muh, J.P., Andres, C., 2003a. The oligodendrocyte-myelin glycoprotein gene is highly expressed during the late stages of myelination in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 144, 159-68.

- Vourc'h, P., Moreau, T., Arbion, F., Marouillat-Vedrine, S., Muh, J.P., Andres, C., 2003b. Oligodendrocyte myelin glycoprotein growth inhibition function requires its conserved leucine-rich repeat domain, not its glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Neurochem.* 85, 889-97.
- Waites, C.L., Craig, A.M., Garner, C.C., 2005. Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci.* 28, 251-74.
- Walsh, F.S., Doherty, P., 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13, 425-56.
- Wang, B., Xiao, Z., Chen, B., Han, J., Gao, Y., Zhang, J., Zhao, W., Wang, X., Dai, J., 2008a. Nogo-66 promotes the differentiation of neural progenitors into astroglial lineage cells through mTOR-STAT3 pathway. *PLoS One.* 3, e1856.
- Wang, J., Chan, C.K., Taylor, J.S., Chan, S.O., 2008b. The growth-inhibitory protein Nogo is involved in midline routing of axons in the mouse optic chiasm. *J Neurosci Res.* 86, 2581-90.
- Wang, J., Chan, C.K., Taylor, J.S., Chan, S.O., 2008c. Localization of Nogo and its receptor in the optic pathway of mouse embryos. *J Neurosci Res.* 86, 1721-33.
- Wang, K.C., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Segal, R., He, Z., 2002a. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature.* 420, 74-8.
- Wang, K.C., Koprivica, V., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R.L., He, Z., 2002b. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature.* 417, 941-4.
- Wang, X., Chun, S.J., Treloar, H., Vartanian, T., Greer, C.A., Strittmatter, S.M., 2002c. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci.* 22, 5505-15.
- Watanabe, T., Niki, H., 1985. Hippocampal unit activity and delayed response in the monkey. *Brain Res.* 325, 241-54.
- Watari, A., Yutsudo, M., 2003. Multi-functional gene ASY/Nogo/RTN-X/RTN4: apoptosis, tumor suppression, and inhibition of neuronal regeneration. *Apoptosis.* 8, 5-9.
- Weiner, J.A., Chun, J., 1997. Png-1, a nervous system-specific zinc finger gene, identifies regions containing postmitotic neurons during mammalian embryonic development. *J Comp Neurol.* 381, 130-42.
- Wilson, S.W., Rubenstein, J.L., 2000. Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron.* 28, 641-51.
- Witter, M.P., Amaral, D.G., 2004. Hippocampal formation. In: *The rat nervous system* (Third Edition). Paxinos, G., ed. Academic Press. San Diego. pp: 635-704
- Witter, M.P., 2007. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res.* 163, 43-61.
- Wrathall, J.R., Li, W., Hudson, L.D., 1998. Myelin gene expression after experimental contusive spinal cord injury. *J Neurosci.* 18, 8780-93.
- Xie, F., Zheng, B., 2008. White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp Neurol.* 209, 302-12.
- Yamamoto, S., Oka, S., Inoue, M., Shimuta, M., Manabe, T., Takahashi, H., Miyamoto, M., Asano, M., Sakagami, J., Sudo, K., Iwakura, Y., Ono, K., Kawasaki, T., 2002. Mice deficient in nervous system-specific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. *J Biol Chem.* 277, 27227-31.

- Yang, Y.S., Strittmatter, S.M., 2007. The reticulons: a family of proteins with diverse functions. *Genome Biol.* 8, 234.
- Yiu, G., He, Z., 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 7, 617-27.
- Yokota, Y., Gashghaei, H.T., Han, C., Watson, H., Campbell, K.J., Anton, E.S., 2007. Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. *PLoS One.* 2, e794.
- Yuste, R., Bonhoeffer, T., 2001. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 24, 1071-89.
- Zhang, L., Zheng, S., Wu, H., Wu, Y., Liu, S., Fan, M., Zhang, J., 2009a. Identification of BLYS (B lymphocyte stimulator), a non-myelin-associated protein, as a functional ligand for Nogo-66 receptor. *J Neurosci.* 29, 6348-52.
- Zhang, Z., Xu, X., Zhang, Y., Zhou, J., Yu, Z., He, C., 2009b. LINGO-1 interacts with WNK1 to regulate nogo-induced inhibition of neurite extension. *J Biol Chem.* 284, 15717-28.
- Zhao, X.H., Jin, W.L., Wu, J., Mi, S., Ju, G., 2008. Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta and up-regulation of LINGO-1 are involved in LINGO-1 antagonist regulated survival of cerebellar granular neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 28, 727-35.
- Zheng, B., Ho, C., Li, S., Keirstead, H., Steward, O., Tessier-Lavigne, M., 2003. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron.* 38, 213-24.
- Zheng, B., Atwal, J., Ho, C., Case, L., He, X.L., Garcia, K.C., Steward, O., Tessier-Lavigne, M., 2005. Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 1205-10.
- Zhu, H.Y., Guo, H.F., Hou, H.L., Liu, Y.J., Sheng, S.L., Zhou, J.N., 2007. Increased expression of the Nogo receptor in the hippocampus and its relation to the neuropathology in Alzheimer's disease. *Hum Pathol.* 38, 426-34.
- Zimmer, J., 1971. Ipsilateral afferents to the commissural zone of the fascia dentata, demonstrated in decommissurated rats by silver impregnation. *J Comp Neurol.* 142, 393-416.
- Zito, K., Svoboda, K., 2002. Activity-dependent synaptogenesis in the adult Mammalian cortex. *Neuron.* 35, 1015-7.
- Zou, Y., Lyuksyutova, A.I., 2007. Morphogens as conserved axon guidance cues. *Curr Opin Neurobiol.* 17, 22-8.
- Zuo, Y., Yang, G., Kwon, E., Gan, W.B., 2005. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature.* 436, 261-5.

ANEXO

INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO

Por la presente, hago constar el *Factor de Impacto* correspondiente a las revistas donde se han publicado los artículos científicos que conforman la Tesis Doctoral presentada por Vanessa Gil Fernández.

- Developmetal Neurobiology (previamente Journal of Neurobiology): 3.84
- Cerebral cortex: 5.907
- Journal of Neuropathology and Experimental Neurology: 4.371

Dr. José Antonio del Río Fernández
Director de Tesis
Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Barcelona