

Universidad Autónoma de Madrid
Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares
Departamento de Biología Molecular
Facultad de ciencias



**Papel de R-Ras1 y R-Ras2 en los
procesos de mielinización del Sistema
Nervioso Central**

TESIS DOCTORAL

Miriam Sanz Rodríguez

Madrid 2018

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de ciencias
Departamento de Biología Molecular



Papel de R-Ras1 y R-Ras2 en los procesos de mielinización del Sistema Nervioso Central

Trabajo de investigación que presenta

Miriam Sanz Rodríguez

Licenciada en Biología

Para optar al título de Doctor en Ciencias

Por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid 2018

Fdo. Miriam Sanz Rodríguez

Dirigida por la Doctora

Beatriz Cubelos Álvarez

Profesor titular por la Universidad Autónoma de Madrid

Fdo. Dra. Beatriz Cubelos

Trabajo realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”



Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), bajo la dirección de la Dra. Beatriz Cubelos Álvarez y financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2015-64829-S and SAF2012-31279).

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Nunca se me ha dado bien agradecer con palabras. Es imposible decir todo lo que uno siente solo con letras garabateadas que se unen formando sentidos. Me quedaré corta, seguro, pero intentaré acercarme lo máximo a lo que siento mientras escribo.

Antes de nada, quería dar las gracias a todos los que habéis compartido mi camino. Puede que algunos sigáis en él, otros estaréis lejos, o tal vez incluso ya no estéis. Quiero que tengáis claro que todos habéis dejado algo de vosotros en mí, y nunca pararé de agradecerlos.

Gracias a todos mis compañeros del CBM, a todos los que saludáis y sonreís. A las personas maravillosas que trabajan en los servicios de animalario, genómica, microscopía electrónica, en la puerta, en la limpieza... hacéis que nuestro trabajo y nuestro día a día sean mucho más fáciles. Sois grandes profesionales y os merecéis toda nuestra gratitud.

Muchas gracias a las chicas del 426, Inés, Tania, María, Viviana, Fabiana, Luisa, Flor, nada hubiese sido igual sin vosotras. Espero que todo os vaya genial, porque os merecéis lo mejor. Sois mujeres inigualables, excepcionales. Tenedlo en cuenta siempre que alguien os haga dudar. Habéis llegado vosotras solitas hasta aquí arriba, podéis con todo lo que os echen.

Muchas gracias también a los chicos del 426, Kurro, Marcos, Juan, Javi. Siempre habéis mantenido el humor en el laboratorio y eso se agradece muchísimo. Y bueno, Javi, ya sabes que tú para mí no eres sólo un compañero. Eres mi amigo, un gran amigo. Todos nuestros congresos, viajes, escapadas, nuestros cafés de dos horas... ocupan un gran lugar en mi corazón. Estos últimos años no han podido ser tan frecuentes, pero siempre encuentras un huequito para verme y hacerme sonreír. Eres el mejor y espero que siempre estés a mi lado (pero no en la poyata eh? que eres muy territorial jajaj).

Muchas gracias Lara, Irene, Maria José, Mario, Sergio, por acogernos como lo habéis hecho en el laboratorio. Sois excepcionales. Nunca había estado tan a gusto en ningún sitio. Pasamos muchas horas en los laboratorios y es un verdadero privilegio hacerlo junto a personas y científicos tan brillantes como vosotros.

Y, sobre todo, gracias a ti Paco, por habernos dado la oportunidad de crecer tanto científica como personalmente en un laboratorio de tanta calidad como es el 206. Gracias por tus consejos, las palabras de apoyo y por buscar siempre una solución, no más problemas. A pesar de las dificultades, todo es más fácil aquí. Gracias por dejarme formar parte del equipo, gracias por todo.

Mil gracias a mis biólogos favoritos, Susana, Nuria, Felipe, porque, aunque nos veamos poco o menos, siempre estáis ahí. Pasan los años y cada vez os quiero y os valoro más. Os debo muchas cañas y os las voy a devolver todas. Os quiero.

Y a ti, María, la dulzura, la locura y el ingenio en un solo envase, eres la mejor y sé que todo te va a ir genial en la vida. Tengo muchísimas ganas de acabar, darte un super achuchón y hacerte una visita legendaria.

Y mil millones de gracias Lidia, Sergio, Tere, Gus, Borjis, Mariana, Sara, Marina, Natán, Sony, Dani, Blanca, primo Dani, Bea.... Bueno a todos, que somos infinitos! Sois los mejores chicos. Os adoro!.

Y a mis Immune Ladies.... Os echo un montón de menos y os doy mil gracias por haberme apoyado tanto. Marina, Paty, Anaïs, Maleny os quiero muchísimo. Sois grandes, magnificas...y taaan majas.

What can I say about you guys? You already know how much you mean to me. You are my family, my lovely world family. I am looking forward to seeing you again. I miss you every day of my life, but I know that you are always with me. I love you erasmus: Ale, Martina, Manu, Chris, Nickie, Angie, Ana, Esther.

Y bueno, Ana, ya sabes que tú eres el pegamento de esta familia. Mi suerte empezó cuando te conocí, mejor dicho, cuando me descubriste entre tanta gente. Eres, simple y maravillosamente genial. La persona más activa (aunque tú digas lo contrario), luchadora, tenaz y brillante que conozco. Significó mucho para mí ser tu maestra de ceremonias y espero ser muchas más cosas en tu vida. Me quieres incondicionalmente. Conoces todos mis defectos y los respetas, no urgas ni te cebas en ellos. Eres la mejor amiga que se puede tener. Siempre a mi lado. Te quiero Ana. Y tú, Steve, mejor *teacher*, mejor amigo y mejor novio de amiga del mundo.... Eres el mejor! Gracias por tu alegría, por las clases, por las conversaciones de verdad... siempre es un placer estar contigo, con vosotros. Os quiero chicos.

Sé que estaríais muy orgullosos de mí, y que vendríais a escuchar la charla y a celebrarlo conmigo, como habéis hecho siempre con todos mis pequeños logros... os echo de menos, abuelo Juan, abuela Gloria, abuelo Pepe. Gracias por haberme querido tanto, y por seguir a mi lado, cuidándome y animándome. Os quiero.

Y tú, que siempre, siempre me escuchas, me aconsejas con sabias palabras y me abrazas como si me fuese a escapar del mundo, calmando todo mal, toda angustia y todo miedo. Eres mi heroína abuela. La mujer que puede con todo, que no le teme a nada. Fuerza, coraje, perseverancia y ternura, todo en un junco, que no se deja mecer al viento, sino que se mueve a voluntad. Te quiero abuela Mari.

Y todos vosotros, la familia más maravillosa que uno puede imaginar. En las buenas, en las malas, siempre juntos. Os quiero Jose, Josefina, Glori, Ricardo, María, Gustavo, Fina, Fernando (me encanta que me digas "mi sobrina la científica"), Irene, Fer, Lauri, tía Chelo. Gracias por ser quienes sois y por formar parte de mi vida.

Pilar, José Luis, gracias a vosotros también porque ya somos todos parte de un todo cada vez más grande y más bello. Sois encantadores, geniales y siempre nos quedamos con ganas de vosotros cuando os marcháis. Gracias por el interés y el respeto que siempre mostráis por todo lo que hago, me hace muy feliz. Tengo muchas ganas de ir a Lugo, mi segunda casa. Os quiero chicos.

Muchas gracias a ti, que me enseñaste la otra cara de la ciencia. Una ciencia bella, trabajosa y costosa, pero, sobre todo, hermosa y posible. Contigo aprendí, que uno puede amar sus resultados, incluso siendo crítico con ellos. Me enseñaste a confiar en mí, en mi criterio, en mi forma de pensar. Has puesto mucho, mucho de ti en mí y espero que te sientas orgullosa. No has sido solo

una jefa excelente, o una mentora sin igual, sino que te has convertido en una de mis personas favoritas, en una amiga muy especial. Eres brillante, y las personas a tu alrededor adquieren ese brillo, esa energía que te caracteriza. Por todo, gracias, muchas, muchas gracias Bea.

Vosotros me disteis la vida, no una, sino dos veces, sacándome del pozo en el que tropecé. Pusisteis cada una de las piedras que hoy construyen este castillo, fuerte, constante, auténtico. No podría imaginar unos padres mejores, no los hay. Os he visto luchar, contra viento y marea, aguantar tempestades juntos, mostrando siempre la sonrisa más sincera. Os adoro, os admiro y quiero que sepáis que todo, todo en lo que me he convertido os lo debo a vosotros. Muchas gracias mama, muchas gracias papa.

Y vosotros tampoco os quedáis atrás, mis compañeros de juegos, de risas, de llantos y de aventurillas. Me enseñasteis todo lo que sabíais sobre la vida sin pedirme nada a cambio, y marcasteis vuestra esencia a fuego en mi persona. Soy incapaz de deciros todo lo que fuisteis, sois y seréis... Nuri, Juan, gracias por crecer conmigo y por haber traído a personas tan maravillosas como Sergio y Raquel a mi vida. Nuri, gracias, gracias y mil gracias por Noa. Ya te lo dije, admiro tu valentía, tus ganas, tu eterna sonrisa. Mi hermanita mayor que siempre me protege. Hemos pasado de todo juntas, nuestra conexión traspasa este mundo. Te quiero y te lo debo todo.

Y tú, princesita, eres la alegría, la inocencia, la picardía y la sonrisa. La niña de los “momos”, de los “dedés”... Aún eres muy pequeña para entender lo que te voy a decir, pero te lo leeré dentro de unos años. Serás una mujer fabulosa, una luchadora empedernida, como todas las mujeres de la familia. Podrás con todo lo que se te ponga por delante, no lo dudes ni por un instante. Noa, eres luz y nos iluminas el camino a todos. No cambies lucecilla.

Tuk, tú nunca te enterarás de que te escribo estas palabras, pero cuando llego a casa sabes que mi sonrisa, mi mirada y mis palabras dicen gracias. Desde que te adoptamos soy más y más feliz.

Mi bolita, todavía me quedan unos meses para verte y ya te siento, ya te quiero. Me has dado la fuerza que necesitaba para terminar. Has abierto mis ojos a un nuevo mundo, a mi nueva yo, y debo decir, que me encanta lo que veo. Te quiero mi chiquitín. Cuídate mucho ahí dentro, espero que estés a gusto.

Y que puedo decir de ti sin quedarme a años luz de la realidad. Mi compañero de vida, mi sol, mi luna, mis estrellas, mi suerte, mi todo. Tú, te has ganado esta tesis tanto como yo... todos los llantos, los no puedo, los no aguanto más... y tú, al pie del cañón, sacando la mejor de las sonrisas, el abrazo más cálido, la palabra más reconfortante. Cada día me recuerdas lo que soy devolviéndome a la realidad, una realidad fuera del mundo, del estrés, de los agobios, nuestra realidad, nuestro hogar, nuestro universo maravilloso. No hay yo sin ti, no hay nada sin nosotros. Te quiero, te adoro, o, como diría un gran amigo nuestro... “me caes bien chico”. Gracias Jesús, gracias, gracias y mil millones de gracias, mil millones de veces. No conozco a nadie tan bueno, tan altruista y valiente como tú. Eres la paciencia y la bondad, en la persona más maravillosa del universo. Estoy deseando empezar esta nueva etapa juntos, no puedes imaginarte cuánto. Eso sí, te prometo que a partir de ahora tendremos vacaciones todos los años, y cada vez más numerosas ;) Siempre conmigo.

Índice

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	9
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN	17
Patologías asociadas a la mielina	
Esclerosis múltiple	17
Neuromielitis óptica	18
Leucodistrofias	18
Enfermedad de Charcot Marie-Tooth	19
Importancia de la mielinización	19
Estructura de la interacción OL-Axón	22
Generación de OPCs	23
Maduración de los OPCs a OLs diferenciados y mielinizantes	24
Formación de las vainas de mielina	26
Comunicación entre OL y axón	27
Rutas de señalización implicadas en la mielinización	28
La superfamilia Ras	30
La familia Ras	33
La subfamilia R-Ras	33
R-Ras1	35
R-Ras2	36
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43
Animales	43
Western blot	45
Inmunohistoquímica: Preparación de tejidos	48
Inmunohistoquímica: Tinciones	50
Análisis de proliferación: BrdU	52
Tinción con azul de Toluidina	52
Reacción X-Gal	52
Microscopía electrónica	53
Cultivos primarios de OLs	54
RT-qPCR	55
Electrofisiología	56

Análisis estadístico	56
RESULTADOS	61
BLOQUE I. FUNCIÓN DE R-RAS1 Y R-RAS2 EN OLS	61
1. R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en OLS.	61
1.1. R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en los principales tractos mielinizados del SNC	61
1.2. R-Ras1 y R-Ras2 son expresados por los OLS en el SNC	62
2. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para mantener la población oligodendrocitaria de los principales tractos mielinizados del SNC.	63
3. R-Ras1 y R-Ras2 no están implicados en la generación, la proliferación ni la migración de los OPCs.	65
4. La ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 provoca un aumento en la apoptosis de las células oligodendrogiales a P30	67
5. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para una correcta mielinización.	68
5.1. La expresión de las proteínas típicas de la mielina está disminuida en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2.	68
5.2. El grosor de las vainas de mielina está reducido en los ratones <i>R-Ras1^{-/-}</i> , <i>R-Ras2^{-/-}</i> y <i>R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}</i>	72
5.3. Los mutantes <i>R-Ras2^{-/-}</i> y <i>R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}</i> mostraron una disminución en el número de axones mielinizados.	75
5.4. La estructura, el grado y la periodicidad de la compactación de la mielina no se ve afectada en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2.	76
6. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 aumenta en número de axones con diámetros más pequeños en detrimento de los axones de mayor diámetro.	77
7. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta diferenciación de los OLS.	78
7.1. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 se produce un aumento en el número de OLS que expresan marcadores de inmadurez.	78
7.2. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 se produce una disminución en el número de OLS maduros.	81
7.3. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta diferenciación morfológica de los OPCs en OLS maduros in vitro.	82
8. R-Ras1 y R-Ras2 modifican el tamaño y el número de los nódulos de Ranvier y, por tanto, la velocidad de conducción.	84
8.1. La falta de R-Ras1 y R-Ras2 conlleva un aumento del número de nodos de Ranvier y, por tanto, vainas de mielina más cortas.	84

8.2. La falta de R-Ras1 y R-Ras2 conlleva un aumento en la proporción de nodos más cortos en detrimento de los más largos sin afectar la longitud de los paranodos.	86
9. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta transmisión del impulso nervioso	87
10. La ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 reduce la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2-MAPK.	89
10.1. La ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 provoca una disminución en la actividad de la vía PI3K/Akt	90
10.2. La ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 provoca una disminución en la actividad de la vía MAPK/Erk1/2	92
11. La función de R-Ras1 y R-Ras2 es específica en mielinización no siendo compensada por otros miembros de la superfamilia.	93
11.1. La función de R-Ras1 y R-Ras2 en mielinización no puede ser suplida por R-Ras3.	93
11.2. La función de R-Ras1 y R-Ras2 en mielinización no puede ser suplida por las Ras clásicas.	94
BLOQUE II. EXPRESIÓN DE R-RAS1 Y R-RAS2 EN DISTINTAS REGIONES DEL SNC	96
1. Patrón de expresión de R-Ras1 y R-Ras2 en el SNC	96
2. R-Ras1 y R-Ras2 son expresados por neuronas, pero no por astrocitos o microglía.	100
DISCUSIÓN	105
R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en los oligodendrocitos de los principales tractos mielinizados del SNC	105
R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para mantener la población oligodendrocitaria de los principales tractos mielinizados del SNC.	105
R-Ras1 y R-Ras2 no están implicados en la generación ni en la proliferación de los OPCs, pero sí en su supervivencia.	106
R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para una correcta mielinización.	106

R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta diferenciación de los OLs.	108
R-Ras1 y R-Ras2 modifican el tamaño y el número de los nódulos de Ranvier y la velocidad de conducción del axón en el nervio óptico.	109
La ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 reduce la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2-MAPK.	109
La función de R-Ras1 y R-Ras2 es específica en mielinización no siendo compensada por otros miembros de la superfamilia	111
Patrón de expresión de R-Ras1 y R-Ras2 en el SNC	113
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXO I: PUBLICACIONES	133

Abreviaturas

ABREVIATURAS

AD: autosómica dominante

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AEP: área preóptica

AQP4: Aquoporina 4

AR: autosómica recesiva

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero también aparece escrito con las siglas en inglés mRNA.

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BrdU: Bromodesoxiuridina

CB: cerebelo

CC: cuerpo calloso

Cldn11: Claudina 11

CMT: Charcot-Marie-Tooth

CNPasa: 2'-3'-fosfodiesterasa-cíclica

CX: corteza

DAB: Diaminobencidina

DC: células dendríticas

DE: desviación estándar

DIV: días in vitro

E: día embrionario

EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental

EM: Esclerosis múltiple

ERK: Proteína quinasa regulada por señales extracelulares

Erk1/2/MAPK: ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógenos

FBS: Suero fetal bovino

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

GalC: galactocerebrósido C

GAPs: Proteínas activadoras de la actividad GTPasa

GDP: Guanosín difosfato

Abreviaturas

- GEFs:** factor intercambiador de nucleótido de guanina
- GTP:** Guanosín trifosfato
- HP:** hipocampo
- IGF1:** factor de crecimiento insulínico 1
- kDa:** Kilodalton
- LGE:** eminencia ganglionar lateral
- LV:** ventrículos laterales
- MAG:** la glicoproteína asociada a mielina
- MBP:** proteína básica de la mielina
- MGE:** eminencia ganglionar medial
- MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad
- MOG:** la glicoproteína oligodendrocítica de mielina
- NEO:** Neomicina
- Neo:** Neomicina
- NG2:** neuroglicano condroitin sulfato
- NMO:** Neuromielitis óptica
- NRG1/III:** neuroregulina-1 tipo III
- O/N:** durante la noche
- OL:** oligodendrocito
- OLs:** oligodendrocitos
- ON:** nervio óptico
- OPC:** Célula progenitora de OLs
- OPCs:** Células progenitoras de OLs
- P:** día postnatal
- PBS:** Solución salina tamponada de fosfato
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- PDGFR α :** receptor de tipo α para el factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PFA:** Paraformaldehído
- PI3K/Akt:** vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt)
- PLP:** Proteína proteolípida
- PMD:** Pelizaeus-Merzbacher
- PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PSA-NCAM: molécula de adhesión celular neuronal polisialilada

PTEN: fosfatasa de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

Ras: oncoproteínas Ras sarcoma

R-Ras: proteínas relacionadas con RAS, del inglés Ras-related

RT: temperatura ambiente

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

S473: Serina 473

S6: Proteína ribosomal S6

SC: médula espinal

SDS-page: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

Sirt2: Sirtuina 2

SN: sistema nervioso

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

SVZ: zona subventricular

T308: Treonina 308

TBS: Salino tamponado

Tcf4: factor de transcripción 4

THT: tálamo-hipotálamo

Resumen

RESUMEN

Una correcta mielinización es esencial para la transmisión rápida y eficaz de la información a lo largo de los axones. Modificaciones en la mielina serán, por tanto, las responsables de alterar la capacidad de los axones para transmitir impulsos eléctricos, produciéndose graves patologías. En el Sistema Nervioso Central (SNC), los oligodendrocitos (OLs) son el único tipo celular responsable de la mielinización, un proceso complejo que involucra a dos vías principales de señalización, la vía PI3K/Akt y la vía Erk1/2/MAPK. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos moleculares comunes que regulan a estas rutas moleculares, orquestando correctamente la mielinización. En este estudio, demostramos que los OLs de los principales tractos mielinizados del SNC expresan las GTPasas R-Ras1 y R-Ras2. Utilizando ratones mutantes carentes de R-Ras1 (*R-Ras1^{-/-}*), R-Ras2 (*R-Ras2^{-/-}*) o de ambas proteínas (*R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*), encontramos que la activación de las rutas PI3K/Akt y Erk1/2/MAPK está disminuida comparada con los ratones control, lo que sugiere que ambas proteínas coordinan la actividad de estas dos vías en OLs. La pérdida de R-Ras1 y/o R-Ras2 provoca la disminución del número de OLs en los principales tractos mielinizados del CNS, y ocasiona un aumento en la proporción de OLs inmaduros en detrimento de los maduros. Además, *in vitro* OLs carentes de R-Ras1 y R-Ras2 muestran morfologías aberrantes y no se diferencian correctamente. La disminución en la población oligodendrocitaria, junto con los defectos observados en su maduración, son los responsables de una hipomielinización severa. Asociada a esta hipomielinización, los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* muestran un aumento en el número de nódulos de Ranvier, junto con una disminución en la longitud de los mismos. Estos defectos explican la disminución en la velocidad de conducción del impulso nervioso observada en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2. En conjunto, estos resultados sugieren que R-Ras1 y R-Ras2 participan conjuntamente en la regulación de la activación de las vías PI3K/Akt y Erk1/2 MAPK desempeñando un papel esencial en la supervivencia y la diferenciación de los OLs, siendo, por tanto, elementos clave para la mielinización. Por todo ello, R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta integración de la información sensorial, motora y cognitiva.

Summary

SUMMARY

Rapid and effective neural transmission of information requires correct axonal myelination. Modifications in myelination alter axonal capacity to transmit electric impulses and enable pathological conditions. In the central nervous system (CNS), oligodendrocytes (OLs) myelinate axons, a complex process involving PI3K/Akt and Erk1/2/MAPK molecular pathways. However, little is known about the mechanisms that orchestrate correct myelination. In our study, we demonstrate that OLs of the principal myelinated tracts express R-Ras1 and R-Ras2. Using mutant mice lacking R-Ras1 (*R-Ras1*^{-/-}), R-Ras2 (*R-Ras2*^{-/-}) or both proteins (*R-Ras1*^{-/-};*R-Ras2*^{-/-}), we find that activation of the PI3K/Akt and Erk1/2/MAPK pathways is weaker compared with control mice, suggesting that both proteins coordinate the activity these two pathways in OLs. Loss of R-Ras1 and/or R-Ras2 diminishes the number of OLs in major myelinated CNS tracts and increases the proportion of immature OLs. In *R-Ras1*^{-/-} and *R-Ras2*^{-/-} null mice, OLs show aberrant morphologies *in vitro* and fail to differentiate correctly into myelin-forming phenotypes. The smaller OL population and abnormal OL maturation induce severe hypomyelination, with shorter nodes of Ranvier in *R-Ras1*^{-/-} and/or *R-Ras2*^{-/-} mice. These defects explain the slower conduction velocity of myelinated axons we observed in the absence of R-Ras1 and R-Ras2. Together, these results suggest that R-Ras1 and R-Ras2 are upstream elements that regulate the survival and differentiation of progenitors into OLs through the PI3K/Akt and Erk1/2/MAPK pathways for proper myelination. Therefore, we conclude that R-Ras1 and R-Ras2 are essential for the proper myelination of axons and the correct transmission of nerve impulses, essential requirements for proper sensory, motor and cognitive integration.

Introducción

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso (SN) constituye una de las estructuras más complejas del organismo. Es el encargado de coordinar las funciones vitales, así como de relacionarnos con nuestro entorno. En él, se integran numerosos tipos celulares que se comunican entre sí, formando redes complejas y organizadas responsables del buen funcionamiento de todo el sistema. Estos tipos celulares están divididos en dos subgrupos, por un lado, las neuronas, células excitables encargadas de la transmisión de la información. Por otro lado, las células gliales (OLs, células de Schwann, astrocitos y microglia) que son necesarias para el soporte fisiológico y el mantenimiento de la homeostasis neuronal. Concretamente, los OLs tienen otras múltiples funciones imprescindibles para una adecuada actividad neural, entre ellas, cabe destacar la mielinización (Byrne et al., 2014). La mielinización es un proceso esencial para la correcta transmisión del impulso nervioso. La rápida propagación de la actividad eléctrica por el axón es fisiológicamente necesaria para integrar la información sensorial, motora y cognitiva. Alteraciones en la mielina van a modificar la capacidad de los axones de conducir los impulsos eléctricos produciéndose graves patologías.

Patologías asociadas a la mielina

Entre las patologías asociadas a la mielina, cabe destacar las siguientes: esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, leucodistrofias hipomielinizantes o enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. La sintomatología de estas enfermedades es bastante estereotipada, manifestando entre otras, alteraciones motoras, visuales, desequilibrios psiquiátricos como el autismo y afectaciones en el procesamiento de la información sensorial (Frohman et al., 2006).

Las enfermedades desmielinizantes presentan en España una prevalencia moderada-alta de 60 casos por cada 100.000 habitantes, afectando principalmente a adultos jóvenes. Estas enfermedades producen una discapacidad progresiva de larga duración en los pacientes, generando graves repercusiones sobre el ámbito familiar, social y económico-laboral de la persona. Por el momento, no existe un tratamiento curativo definitivo y la investigación sobre sus causas constituye un activo campo de estudio.

Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) la enfermedad neurológica más frecuente en adultos jóvenes, diagnosticándose normalmente entre los 20 y 40 años, ocasionalmente, se presenta en la infancia o en la madurez tardía y se calcula que afecta a más de 2,5 millones de personas en el mundo. Actualmente, unas 47.000 personas padecen EM en España. Se trata de una enfermedad crónica

Introducción

autoinmune y degenerativa del SNC (Reich et al., 2018). Esta enfermedad ataca a los axones mielinizados en el SNC y destruye la mielina y los axones en grados variables (Reich et al., 2018). Se cree que la enfermedad se da en personas genéticamente susceptibles y expuestas a desencadenantes ambientales durante el periodo de mayor vulnerabilidad (Inaloo and Haghbin, 2013). Se clasifica en:

EM recurrente-remitente: Es la más común (85% de los pacientes). Marcada por brotes (recaídas o exacerbaciones), seguidos por períodos de remisión.

EM secundaria progresiva: Puede desarrollarse en pacientes con enfermedad recurrente-remitente. La enfermedad continúa empeorando con o sin períodos de remisión o nivelación de la gravedad de los síntomas (mesetas).

EM progresiva primaria: Presente en el 10% de los pacientes. Los síntomas empeoran gradualmente desde el principio. Pérdida axonal más temprana y sostenida. Deterioro clínico progresivo desde el principio.

EM progresiva recidivante: Forma rara (<5% de los pacientes) y progresiva desde el principio. Los brotes intermitentes empeoran a lo largo de la enfermedad. No hay periodos de remisión.

Neuromielitis óptica

La neuromielitis óptica (NMO) o enfermedad de Devic es una enfermedad rara (-2 casos/100.000 habitantes), inflamatoria, desmielinizante del SNC caracterizada por la afección preferente del nervio óptico y la médula espinal. Normalmente causa ceguera, a veces permanente. También causa debilidad o parálisis en piernas y brazos, pérdida de sensibilidad y problemas en la vejiga, derivados del daño a la médula espinal. Es una enfermedad que se parece a la esclerosis múltiple clásica en muchos aspectos, pero requiere un tratamiento específico. Se considera que hay dos variantes principales: La primera, constituye un 60-90% de los casos y se caracteriza por presentar anticuerpos anti aquaporina-4 (AQP4-positivo) (Fujihara and Leite, 2013). La segunda variante, AQP4-negativo, se considera actualmente idiopática (Marignier et al., 2013).

Leucodistrofias

Las leucodistrofias son enfermedades raras (5 de cada 100.000 habitantes), por lo general genéticas, que se caracterizan por una pérdida de la mielina en el sistema nervioso central y periférico. Aunque estén englobadas dentro de un mismo grupo, las leucodistrofias tienen orígenes muy diversos, como mutaciones que afectan a distintos compartimentos celulares (peroxisomas, mitocondrias y lisosomas), a procesos celulares (el metabolismo de esfingolípidos, del ARN, del ARNt) o a la traducción de proteínas (Mosser et al., 1993; Edvardson et al., 2008;

Henneke et al., 2009; Bugiani et al., 2010; Gieselmann and Krageloh-Mann, 2010; Wong, 2012; Vanderver et al., 2014). Solo algunos genes cuyas mutaciones causan leucodistrofias codifican para proteínas de mielina. A este respecto, el ejemplo clásico es el del gen *PLP1*, causante de la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) y la paraplejía espástica alélica tipo 2 (Saugier-Weber et al., 1994). Estas leucodistrofias hipomielinizantes se caracterizan por problemas en la coordinación, en las habilidades motoras y en el aprendizaje. La diversidad de genes causantes y vías afectadas indica que ninguna terapia puede adaptarse a todos los trastornos o incluso a todos los pacientes con el mismo trastorno.

Enfermedad de Charcot Marie-Tooth

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es la neuropatía hereditaria más frecuente con una prevalencia en España de 28,2 casos por 100.000 habitantes (Combarros et al., 1987). En lo esencial, se trata de un síndrome de inicio infantil o juvenil con patología polineuropática motora y sensitiva, y pie cavo (Dyck et al., 1975; Harding and Thomas, 1980; Pareyson and Marchesi, 2009). Existen 5 tipos de CMT: el tipo I (CMT1, hipertrófico o desmielinizante) que tiene herencia autosómica dominante (AD) o autosómica recesiva (AR); el tipo II (CMT2, neuronal o axonal) con herencia AD o AR; el tipo III (CMT3, usualmente con herencia AR reservado para la enfermedad de Dejerine-Sottas o pacientes con formas graves de CMT hipomielinizante; también existen formas ligadas al cromosoma X y otras formas complejas (p. ej., con atrofia óptica, sordera o degeneración pigmentaria de la retina)(Dyck et al., 1975).

Importancia de la mielinización

Desde un punto de vista evolutivo, la mielina, es una de las adquisiciones más importantes del SN de los vertebrados. Concretamente, ofrece importantes ventajas tales como la protección de los axones, ahorrando espacio y energía, e incrementando hasta 50 veces la velocidad de conducción de la señal eléctrica a través de axones del mismo calibre (Huxley and Stampfli, 1949). De esta manera, permite la rápida integración de la información. En concreto, la mielina, es una diferenciación multilaminar de la membrana plasmática de los OLs en el SNC o de las células de Schwann en el SN periférico (SNP) que se enrollan como una espiral sobre el axón que van a recubrir, haciendo que la maquinaria responsable de la propagación de la señal se distribuya de manera discontinua a lo largo del mismo. De esta manera, la mielina aísla y garantiza que la despolarización de la membrana axonal se produzca exclusivamente en los nódulos de Ranvier (áreas no mielinizadas), dando como resultado una rápida conducción saltatoria del impulso nervioso a lo largo del axón (Huxley and Stampfli, 1949) (Fig. 1).

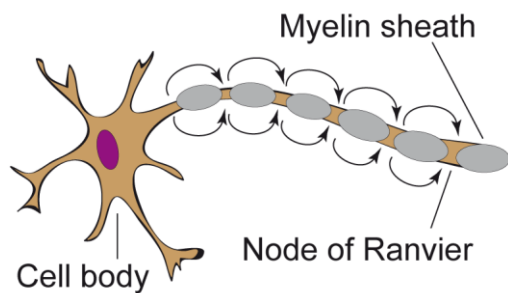


Figura 1. Esquema de la conducción saltatoria del impulso nervioso de nódulo a nódulo de Ranvier.

La mielina, comparada con otras membranas plasmáticas tiene un mayor contenido en lípidos. En la mielina encontramos proteínas fundamentales como: la proteína proteolipídica, (PLP), la proteína básica de la mielina (MBP), la 2`-3`-fosfodiesterasa-cíclica (CNPasa), la glicoproteína asociada a mielina (MAG), la glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG), Sirtuina 2 (Sirt2) y Claudina 11 (Cldn11) (Nave and Werner, 2014).

A pesar de que tanto los OLs como las células de Schwann son capaces de mielinizar, lo cierto es que lo hacen de manera diferente. En el SNP, las células de Schwann elaboran una sola vaina de mielina alrededor de un solo axón, además están rodeadas por una lámina basal continua y extienden procesos celulares que cubren y protegen los nódulos de Ranvier (Fig. 2A). Por el contrario, en el SNC, un solo OL pueden mielinizar hasta 60 axones diferentes, no están cubiertos por lámina basal y no extienden procesos que protejan al nódulo de Ranvier, sino que son los astrocitos perinodales o sinantocitos los encargados de esta protección (Figura 2A, B). Entre el SNC y el SNP existen, además, diferencias en el número de envueltas que realizan alrededor del axón y en la compactación de las mismas junto con diferencias en la composición molecular de la mielina (Tabla 1). Otro punto importante a destacar es que, en el SNP resulta imprescindible para la iniciación de la mielinización y para las posteriores características de las vainas de mielina la señalización por parte del axón con el factor de crecimiento NRG1/III (neuroregulina-1 tipo III) (Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005). En cambio, en el SNC, ese tipo de moléculas instructivas axonales parecen no ser imprescindibles (Brinkmann et al., 2008).

Tabla 1. Diferencias en la composición proteica y lipídica de la mielina en SNC y SNP

PROTEÍNAS	SNC	SNP
Proteína proteolipídica (PLP)	> 50%	< 1%
Proteína cero (P0)	No presente	> 50%
Proteína básica de mielina (MBP)	30%	10%

Proteína básica P₂ (P₂)	No presente	Variable (1-15% dependiendo de la especie)
Glicoproteína asociada a la mielina (MAG)	1%	< 1%
Fosfodiesterasa (CNPasa)	40%	< 1%
Proteína periférica de la mielina 22 (PMP22)	No presente	< 5%
LÍPIDOS		
Cerebrósidos y colesterol	Mayor cantidad que en SNP	Menor cantidad que en SNC
Esfingomielina	Menor cantidad que en SNP	Mayor cantidad que en SNC
Glucoesfingolípido cerebrósido	20%	15%

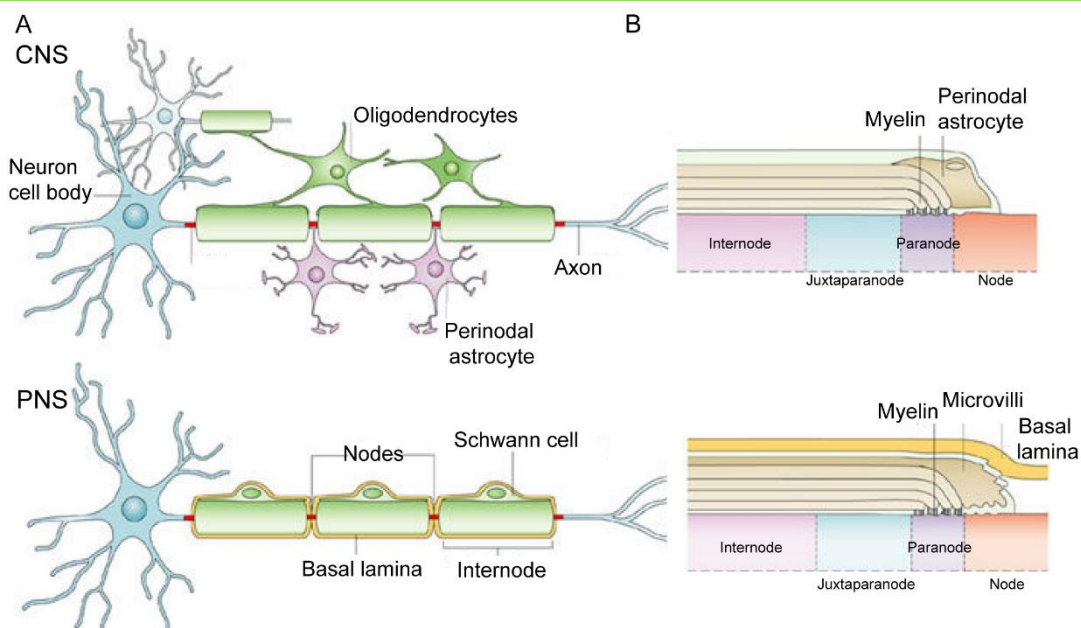


Figura 2. Diferencias en la mielinización del SNC y SNP. *A*, Imagen en la que se observa, la mielinización en el SNC (arriba) y en el SNP (abajo). En el SNC los Oligodendrocitos mielinizan a distintos axones y forman varias vainas de mielina sobre un mismo axón. Además, presentan astrocitos perinodales (sinantocitos) que extienden sus procesos en los nódulos de Ranvier. En el SNP cada célula de Schwann, rodeada por la lámina basal, forma una vaina de mielina en un solo axón (Imagen modificada de Poliak and Peles 2003). *B*, Detalle de la estructura del nódulo de Ranvier. En el SNC se observan

los procesos de los astrocitos perinodales en contacto con el nodo y la vaina de mielina. En el SNP los procesos de las células de Schwann forman microvellosidades que contactan con el nódulo y la vaina de mielina. La lámina basal de la célula de Schwann rodea el internodo y el nódulo de Ranvier adyacente. Imagen modificada de (Poliak and Peles, 2003).

Estructura de la interacción OL-Axón

Los nódulos de Ranvier, son interrupciones cortas y periódicas de las vainas de mielina. La membrana plasmática del axón en el nódulo de Ranvier se denomina axolema nodal y cuenta con una alta densidad de canales de sodio (Na^+) dependientes de voltaje, cuya despolarización es crucial para la conducción del potencial de acción. Los extremos que flanquean los nódulos de Ranvier se denominan paranodos (Fig. 2B, 3). El paranodo es la región en la que las diferentes vainas de mielina se anclan al axolema mediante proteínas como Caspr y contactina expresadas por el axón, unidas a NF-155 expresada por los OLs (Fig. 3). Adyacente al paranodo, se encuentra el yuxtaparanodo (Fig. 2B, 3) que cuenta con una alta concentración de canales de K^+ encargados de la repolarización de la membrana manteniendo así, el potencial de reposo. Durante el desarrollo de los axones mielinizados, los canales de Na^+ se agrupan en los nódulos de Ranvier, seguidos por la formación de la unión paranodal, y más tarde por la agrupación de canales de K^+ en el yuxtaparanodo. Este momento parece depender de las interacciones del axón con la célula glial. Entre nódulo de Ranvier y nódulo de Ranvier encontramos las vainas de mielina denominadas también internodos. Así pues, el internodo es el espacio que ocupa la mielina de nódulo a nódulo.

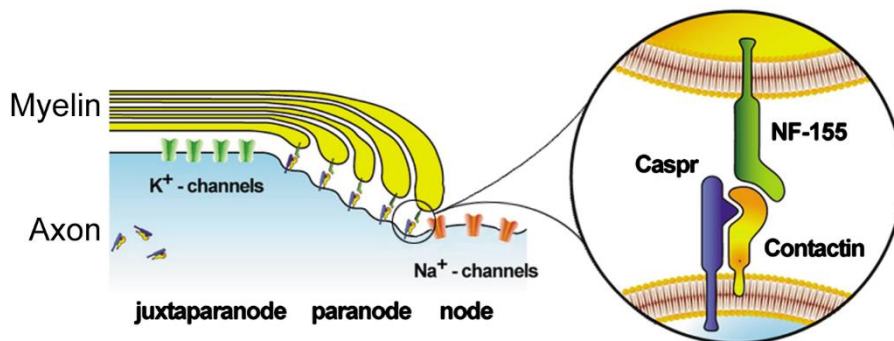


Figura 3. Estructura de la interacción OL-neurona. En la imagen se observa la disposición de las diferentes regiones que se forman en la interacción del OL con el axón neuronal. Los nódulos de Ranvier con abundantes canales de Na^+ , seguidos de los paranodos donde se produce la interacción de las vainas de mielina (NF-155) con el axón (Caspr/contactina) y, por último, seguidos de los yuxtaparanodos, donde se encuentran numerosos canales de K^+ . Imagen modificada de (Boyle et al., 2001).

Generación de los OPCs

Los OLs se generan a partir de las células progenitoras de oligodendrocitos (del inglés “Oligodendrocyte Progenitor Cell” OPCs). Los OPCs se generan en tres oleadas a lo largo del desarrollo embrionario y posnatal. Centrándonos en las regiones anteriores del SNC de ratón, la primera oleada se produce el día embrionario (E) 12,5 en la eminencia ganglionar medial (MGE) y en la que posteriormente será el área pre-óptica, (Tekki-Kessarlis et al., 2001) (Fig. 4A). Estos OPCs migran para colonizar distintas regiones del prosencefalo (Kessarlis et al., 2006; Klambt, 2009). Posteriormente, a E15,5 se produce una segunda oleada de OPCs que surge de la eminencia ganglionar lateral (LGE) (Chapman et al., 2013) y migran dorsalmente al córtex, colonizando el prosencefalo (Kessarlis et al., 2006; Klambt, 2009). Finalmente, en el periodo perinatal (P0) se produce una tercera oleada de OPCs que se generan de manera dorsal en la zona subventricular (SVZ) y migran localmente para colonizar el cuerpo caloso en desarrollo. También contribuyen a la colonización del córtex, mezclándose con los OPCs derivados de las eminencias ganglionares. Los OPCs que migran tempranamente derivados de las dos primeras oleadas y que colonizan el manto cortical son posteriormente reemplazados por la tercera oleada de OPCs.

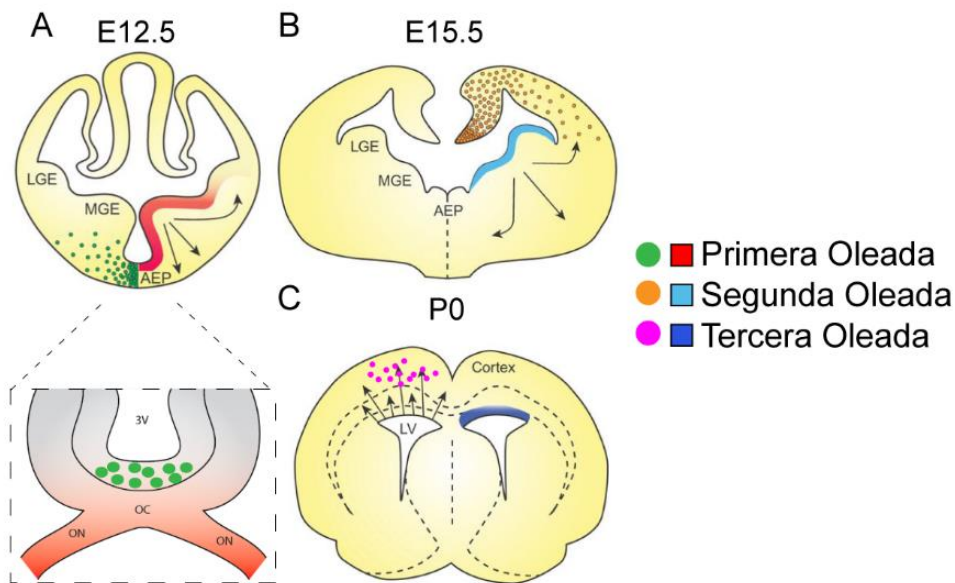


Figura 4. Génesis de OPCs en el prosencefalo de ratón. *A*, primera oleada en la génesis de OPCs que se da en la eminencia ganglionar medial (MGE) y en el área pre-óptica (AEP) cuyos OPCs serán los encargados de colonizar y mielinizar el nervio óptico (ON). *B*, la segunda oleada de génesis de OPCs se produce a E15,5 en la eminencia ganglionar lateral (LGE). *C*, la última oleada de génesis se produce en el nacimiento P0 en la zona dorsal de los ventrículos laterales (LV). Imagen modificada de (Goldman and Kuypers, 2015).

Maduración de los OPCs a OLs diferenciados y mielinizantes

Así pues, tras su generación, los OPCs migran, se distribuyen por el SNC y comienzan a diferenciarse sufriendo una serie de cambios estereotipados, tanto a nivel morfológico, aumentando su complejidad, como a nivel bioquímico, expresando en cada una de las etapas de maduración distintos marcadores (de Castro and Bribian, 2005; Traiffort et al., 2016). Las etapas de maduración del linaje oligodendroglial están divididas en cuatro estadios; OPCs, pre-oligodendrocitos, oligodendrocitos inmaduros o pre-mielinizantes, y oligodendrocitos maduros. Cada una de estas fases se caracteriza además de por cambios morfológicos y bioquímicos, por cambios en la capacidad de migración, proliferación y diferenciación.

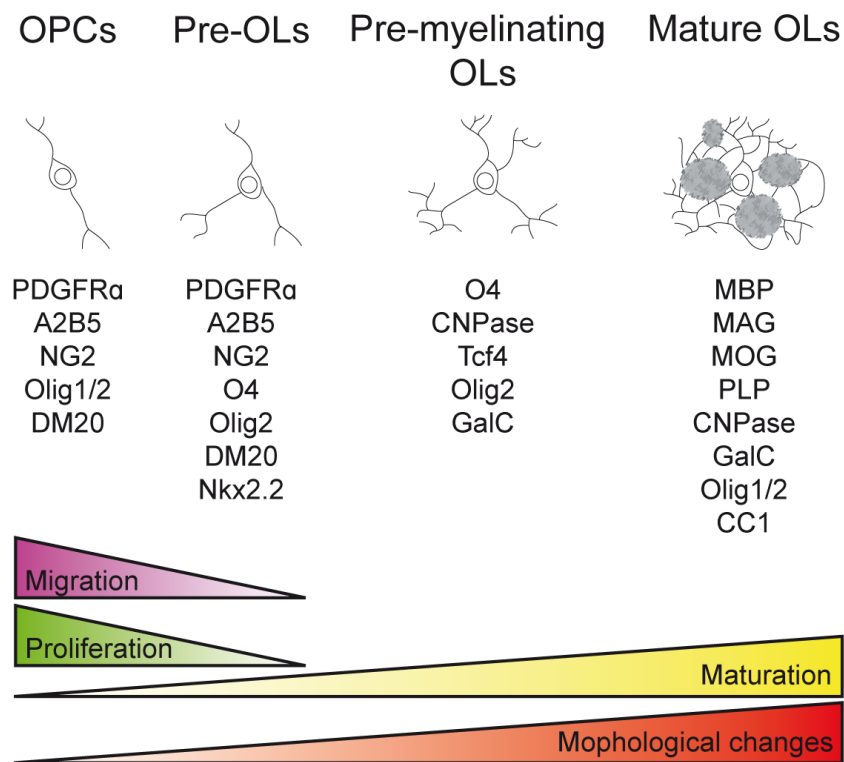


Figura 5. Etapas de maduración de los OPCs a OLs maduros. En esta imagen modificada de Barateiro and Fernandes 2015, se observan las 4 etapas de maduración por las que pasan los OPCs hasta llegar a ser OLs maduros y mielinizantes. Se dan cambios morfológicos, y bioquímicos además de cambios en su capacidad de migración y proliferación.

1. Estadío de maduración OPC: Desde un punto de vista morfológico, los OPC son células bipolares (Fig. 5). Esta morfología les capacita durante esta etapa para proliferar y migrar. A nivel bioquímico, los OPCs expresan una serie de marcadores de membrana como pueden ser el receptor de tipo α para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α), el gangliósido

A2B5 o neuroglicano condroitin sulfato NG2 (Raff et al., 1983; Richardson et al., 1988). No se puede obviar el hecho de que existen diversas subpoblaciones de OLs y que no todas cumplen con la expresión de todos estos marcadores, de hecho, algunas poblaciones de OPCs no expresan PDGFR α ya que no dependen de las señales de traducción mediadas por este receptor. Por el contrario, expresan transcritos del gen *plp* (*plp/dm-20*), perteneciendo posiblemente a otro linaje oligodendroglial (Spassky et al., 2002). Por regla general, una gran parte de los OPCs seguirá madurando llegando a convertirse en OLs maduros y mielinizantes. Ahora bien, no todos los OPCs que se generan llegarán a ser OLs mielinizantes. En el cerebro del adulto, existe un remanente de OPCs, denominados OPCs adultos, que permanecen en su forma inmadura y parecen proporcionar el sustrato por el cual se mantiene el recambio de mielina entre otras funciones (Franklin and Ffrench-Constant, 2008; Crawford et al., 2014). Estos OPCs adultos constituyen alrededor del 5% del total de células del cerebro de ratón adulto (Dawson et al., 2003) y en los últimos años, han despertado un gran interés en la comunidad científica debido a su capacidad para diferenciarse en determinadas condiciones y reemplazar a OLs que mueren fisiológica o patológicamente. También se les ha atribuido una función en la plasticidad de la sustancia blanca (Wang and Young, 2014), pudiendo participar tanto en la mielinización de axones no mielinizados como en la remodelación de las vainas de mielina existentes.

2. Pre-OLs: Morfológicamente, se caracterizan por presentar procesos multipolares cortos. Molecularmente, cambian su patrón de expresión, comenzando a expresar otros marcadores como O4. Su capacidad migratoria y proliferativa en esta etapa es muy escasa.

3. OLs inmaduros o pre-mielinizantes: Estructuralmente, estas células presentan procesos muy ramificados y complejos. Molecularmente, dejan de expresar marcadores como PDGFR α , A2B5 y NG2, pero continúan expresando O4. Empiezan a expresar el galactocerebrósido C (GalC), y CNPasa (McMorris, 1983) y el factor de transcripción Tcf4 (Fu et al., 2009; Emery, 2010). En este momento de su desarrollo pasan a ser células sin capacidad proliferativa ni migratoria.

4. OLs maduros: A nivel morfológico, sus procesos han pasado a ser extremadamente complejos, llegando a formar lamelas que serán las responsables de envainar a los axones. Molecularmente, esta última etapa está caracterizada por la expresión de componentes de mielina, como PLP, MBP, MAG o MOG (Kanfer and McCartney, 1989; Lubetzki et al., 1991; Liu et al., 2002) y la ausencia de expresión de Tcf4. Además, los OLs maduros expresan CC1 (Adenomatous polyposis coli protein) que se utiliza como marcador de OLs maduros (Ishii et al., 2013; Ishii et al., 2014; Jeffries et al., 2016). Los OLs maduros han perdido por completo su capacidad proliferativa y migratoria y serán los encargados de la correcta mielinización del SNC.

Formación de las vainas de mielina

Para la formación de la futura vaina de mielina, en un primer momento que ocurre durante el desarrollo, los OPCs extienden y retraen sus procesos como si fuesen filopodios (Kirby et al., 2006) en busca de contacto con los axones que posteriormente mielinizarán. Una vez establecido el primer contacto con el axolema, el extremo del proceso del OPC se retraerá o, se estabilizará, formando un dominio especializado de membrana para la comunicación continua entre el axón y el OL.

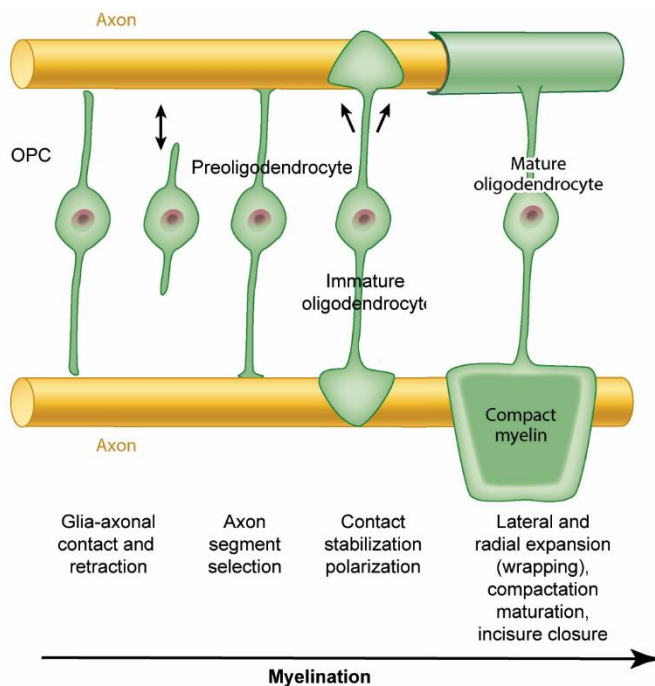


Figura 6. Esquema del proceso de mielinización. La mielinización comienza con el primer contacto del OPC con el axón que posteriormente mielinizará. En este momento, el OPC empieza a madurar y sufrir cambios morfológicos y bioquímicos estereotipados. Una vez han madurado por completo los OLs mielinizantes son capaces de formar las vainas de mielina alrededor de los axones. Imagen modificada de (Nave and Werner, 2014).

La expansión radial y longitudinal de la futura vaina de mielina ocurre de forma simultánea agregándose de manera continua nueva membrana en el extremo creciente de la lengua interna (Snaidero et al., 2014). Al mismo tiempo, la capa más interna de la vaina se expande lateralmente compactándose entre la capa precedente y el axón. Este fenómeno es lo que comúnmente se conoce como “wrapping”. Los sub-dominios citoplásmicos al final de cada lámina de mielina permanecen en estrecho contacto con el axón que recubren moviéndose lateralmente y alrededor de este hacia el futuro nodo, donde eventualmente formaran una serie de bucles paranodales íntimamente yuxtapuestos (Fig. 3).

El hecho de añadir membrana en el extremo en expansión requiere el transporte de componentes que han sido sintetizados en el soma, a través de los procesos oligodendrogiales, lo que supone para el OL un aumento del gasto energético.

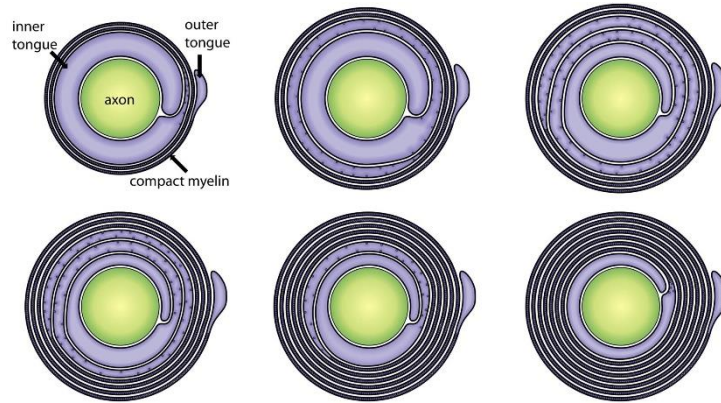


Figura 7. Modelo de mielinización aceptado en la actualidad. En la imagen se muestra cómo las capas de membrana de mielina se compactan durante el crecimiento de la vaina alrededor del axón. La tasa de crecimiento de la lengua interna en el frente junto con los niveles de MBP y CNP determinan el grado de compactación de la membrana. Imagen de (Snaidero et al., 2014)

Comunicación entre OLs y axón.

La diferenciación coordinada del axón y el OL, requiere una estrecha comunicación entre ellos, desde estadios tempranos del desarrollo embrionario para una adecuada mielinización. Tanto la neurona como el OL, desempeñan un papel muy activo en este proceso.

Por su parte, las neuronas proporcionan señales como lamininas, factores de crecimiento (IGF1, FGF, BDNF), ligandos de Notch (Jagged1, F3/contactina) y molécula de adhesión celular (Nave and Werner, 2014) que regulan la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de OLs (Tomassy et al., 2016). Se ha demostrado, que la actividad eléctrica del axón también puede coordinar la mielinización en el SNC. La estimulación optogenética de neuronas de la corteza motora del ratón provocaba un aumento en la proliferación de los OPC y la diferenciación de los OLs, además, el espesor de la vaina de mielina aumentaba a lo largo de los axones de las neuronas que habían sido estimuladas (Gibson et al., 2014).

Por su parte, los OLs pueden diferenciarse y producir grandes cantidades de membrana incluso cuando se cultivan *in vitro* en ausencia de neuronas (Dubois-Dalcq et al., 1986). Sorprendentemente, cuando los OLs se cultivan sobre axones inertes (nanofibras, axones fijados...), aún pueden generar una envoltura de mielina similar a la creada en axones *in vivo* (Tomassy et al., 2016). Esto indica que, en ausencia de actividad eléctrica axonal, los OLs tienen una serie de características intrínsecas que los capacitan para mielinizar. De hecho, los OLs de manera intrínseca, son los responsables de la longitud de las vainas de mielina que generan (longitud de los internodos). Es muy importante destacar, que los OLs son capaces de formar

vainas de diferentes longitudes en función de cuál sea su lugar de origen y sin que las señales neuronales los afecten. Por ejemplo, OLs provenientes de la médula espinal generan siempre vainas más largas que OLs provenientes de la corteza en cocultivos con neuronas o sobre microfibras que simulan axones, demostrando que los OLs tienen identidad regional y generan vainas de diferentes longitudes que reflejan los internodos *in vivo* (Bechler et al., 2015). La longitud del internodo, determinada por las características intrínsecas del OL, tiene una repercusión directa sobre la velocidad de conducción axonal afectando al número de nódulos de Ranvier (Pajevic et al., 2014). Aun así, la correcta comunicación neurona-OL es muy importante. Como resultado de esa estrecha comunicación, las fibras mielinizadas adquieren ciertas características estructurales, como la diferenciación de la membrana axonal en distintos dominios moleculares, estructurales y funcionales además del espesor adecuado.

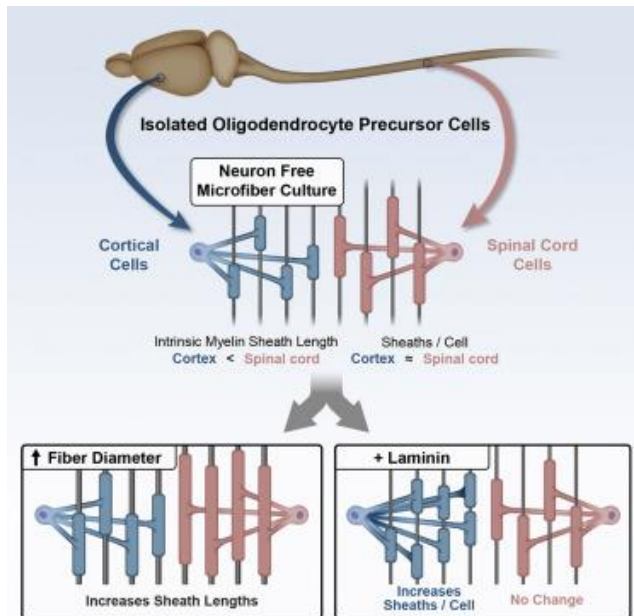


Figura 8. OLs de distintas regiones generan vainas de mielina más o menos largas en función de su origen debido a sus características intrínsecas. El esquema muestra como OLs de diferentes partes del SNC (corteza y médula espinal) generan vainas de mielina de diferentes longitudes sobre axones artificiales en función de su lugar de origen. Imagen de (Bechler et al., 2015).

Rutas de señalización implicadas en la mielinización

Las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2/MAPK entre otras, han demostrado ser esenciales en los procesos de mielinización controlando la supervivencia, migración, diferenciación y mielinización de los OLs (Ness et al., 2002; Romanelli et al., 2009; Ishii et al., 2014; Murcia-Belmonte et al., 2014; Gaesser and Fyffe-Maricich, 2016; Murcia-Belmonte et al., 2016). Por un lado, se demostró que en animales mutantes que tenían Akt constitutivamente activa específicamente en sus OPCs y OLs, se produjo un aumento en la producción de mielina sin que se viera afectada la proliferación, la génesis o el número final de OLs en los adultos (Flores et al.,

2008). Además, comprobaron que, en estos mutantes, proteínas efectoras de la vía PI3K/Akt como mTOR y sus sustratos p70S6 y S6 estaban sobreactivados y la inhibición de mTOR con rapamicina revertía el fenotipo de hipermielinización observado (Narayanan et al., 2009), demostrando que la vía PI3K/Akt/mTOR tiene un papel esencial en la mielinización. Por su parte, ratones mutantes carentes de PTEN (la fosfatasa de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) bajo el promotor más tardío *Cnp* presentaban un fenotipo similar al de los mutantes que expresaban la forma constitutivamente activa de Akt, mostrando hipermielinización, engrosamiento de la sustancia blanca y sin cambios en el número de OLs que en este caso presentaban una morfología hipertrofiada. Además, la hipermielinización en estos mutantes se debía a un aumento en el número de envueltas sin que se viese afectada la ultraestructura o periodicidad de la mielina compacta. Encontraron hipermielinización en axones de todos los calibres, pero, no todas las fibras estaban hipermielinizadas, por lo que se postuló que la señalización vía PI3K en OLs desencadena una señal que difiere en fuerza entre diferentes axones individuales (Goebbels et al., 2010). mTOR además de en mielinización, parece tener un papel muy importante en la diferenciación de los OLs, tanto *in vitro* (Tyler et al., 2009) como *in vivo* (Bercury et al., 2014), además, es imprescindible en el inicio de la mielinización (Wahl et al., 2014). Ratones mutantes carentes de Raptor (proteína esencial para que el complejo mTORC1 sea funcional) bajo el promotor *Cnp* presentaron una dramática pérdida de OLs maduros en la médula y un retraso en la diferenciación de los OLs del cuerpo caloso. Por su parte, la vía Erk/MAPK también ha sido ampliamente estudiada. Al igual que la vía PI3K, parece no ser necesaria para la génesis ni la proliferación de los OPCs (Fyffe-Maricich et al., 2011; Ishii et al., 2012) pero sí para la mielinización. Ratones mutantes carentes de Erk1/2 bajo el promotor de *Cnp* o *Ng2* mostraron una hipomielinización muy acusada sin cambios en la diferenciación de los OPCs a OLs maduros. Parece, por tanto, que Erk1/2 no son críticos para la diferenciación ni para el inicio de la mielinización, pero sí son esenciales para la elaboración adecuada de vainas de mielina (Ishii et al., 2012). Ratones mutantes condicionales de los que se eliminaban Erk1/2 tras la inyección de tamoxifeno, mostraron una ligera disminución de OLs debido a una menor supervivencia de los mismos (Ishii et al., 2014). Además, Erk1/2 son necesarios para el mantenimiento de la mielina del SNC y por consiguiente para mantener la integridad axonal (Ishii et al., 2014) y su activación en OLs maduros conduce a la expansión de las vainas de mielina ya formadas (Jeffries et al., 2016). Aun así, se debe tener en cuenta que la fuerza, la duración y el momento de la activación de Erk1/2 debe estar rigurosamente controlado, ya que su activación sostenida o la falta de ella puede tener efectos en detrimento de la mielinización (Ishii et al., 2016). Se sabe que existe una comunicación estrecha y coordinada entre las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2/MAPK (Gaesser and Fyffe-Maricich, 2016; Furusho et al., 2017), aunque poco se sabe sobre los

mecanismos que median la actividad coordinada de la señalización en estas dos rutas moleculares. Nosotros proponemos, a R-Ras1 y R-Ras2 como elementos clave en la regulación de ambas vías, orquestando de manera coordinada y no redundante los procesos de mielinización (Fig 9).

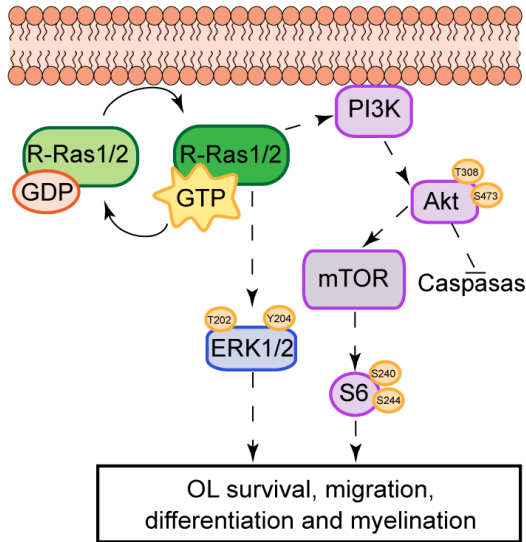


Figura 9. Rutas de señalización implicadas en mielinización. Esta imagen muestra nuestra hipótesis, en la que R-Ras1 y R-Ras2 participan en la regulación de las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y Erk1/2 MAPK. Las flechas o guiones con línea discontinua indican activación o inhibición indirectas respectivamente.

La superfamilia Ras

La superfamilia Ras está formada por unos 150 miembros distribuidos en cinco grandes familias en función de su homología de secuencia. Estas familias son: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf (Fig. 10) (Wittinghofer and Nassar, 1996). Recientemente, otros nombres se han añadido a la lista como Rheb, RGK, Rad, Rit y Miro (Liu et al., 2017). Todas estas proteínas son de pequeño tamaño (20-25kDa) y tienen actividad GTPasa, ciclando entre su estado unido a GDP (estado inactivo) y unido a GTP (estado activo) actúan como interruptores moleculares de diversos eventos dentro de la célula. Todas las familias comparten cierto grado de homología de secuencia, sin embargo, las modificaciones postraduccionales que hacen que presenten diferentes sublocalizaciones en la célula, así como los diversos mecanismos de regulación a los que cada miembro está sujeto, hacen que cada grupo esté especializado en determinados procesos celulares. De manera muy general: la familia Rho desempeña funciones relacionadas con la morfología y con la dinámica del citoesqueleto, Rab con el tráfico de membrana, Ran con el transporte nuclear, y Arf con el transporte vesicular. La familia Ras, por su parte está implicada en procesos de proliferación celular, diferenciación y supervivencia (Wennerberg et al., 2005).

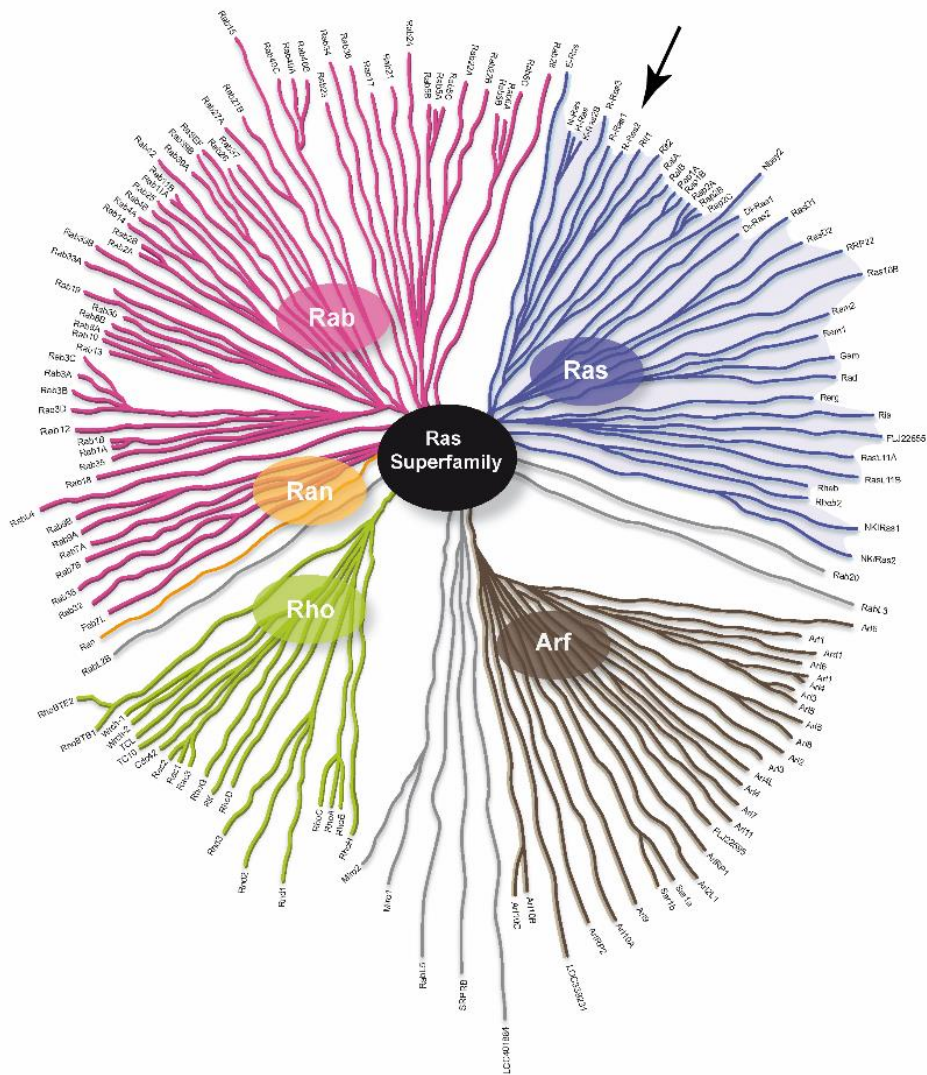


Figura 10. Super familia Ras. En esta imagen se muestran a modo de árbol las 5 familias que conforman la super familia Ras: Ras (en añil), Rab (rosa), Ran (naranja), Rho (verde) y Arf (marrón). Entre todas las familias hay más de 150 miembros. La flecha muestra la localización de los miembros de la subfamilia R-Ras. Adaptado de (Wennerberg et al., 2005).

Estructuralmente, los miembros de esta superfamilia comparten un conjunto de cajas G conservadas con motivos de unión a GDP/GTP comenzando por el extremo N-terminal: **G1**, GXXXXGKS/T; **G2**, T; **G3**, DXXG; **G4**, N/TKXD; and **G5**, S/CAK/L/T (Wennerberg et al., 2005). Juntos, estos elementos constituyen el **dominio G** de alrededor de 20kDa (residuos Ras 5-166) que posee una estructura y bioquímica compartida por todas las proteínas pertenecientes a la superfamilia Ras (Fig.11).

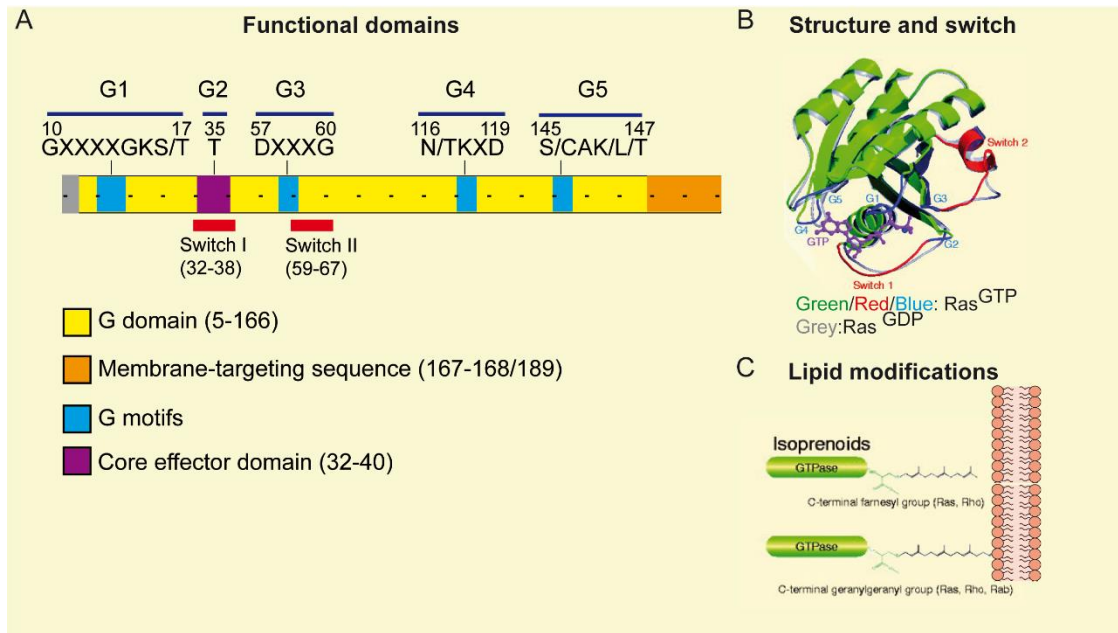


Figura 11. A, Dominios funcionales en la superfamilia Ras. Se detallan en la ilustración todos los motivos que constituyen el dominio G. B, Estructura tridimensional de la familia Ras, se pueden observar en rojo los dominios “switch” y en azul los motivos G. La forma activa de la proteína, unida a GTP se muestra en colores, mientras que la conformación de la forma inactiva, única a GDP, se muestra en gris. C, Modificaciones lipídicas postraduccionales presentes en la familia Ras que les permiten su unión a la membrana plasmática. Adaptado de (Wennerberg et al., 2005).

Otra característica importante compartida por mayoría de las proteínas de la superfamilia Ras es su modificación postraducciona por lípidos. La mayoría de las proteínas de la familia Ras y Rho terminan con una secuencia tetrapeptídica C-terminal CAAX (C = Cys, A = alifático, X = cualquier aminoácido) (Cox and Der, 2002). El motivo CAAX es la secuencia de reconocimiento de la farnesiltransferasa y la geranylgeranyltransferasa I, que cataliza la adición covalente de un isoprenoide farnesilo o geranyl-geranyl, respectivamente, al residuo de cisteína del motivo tetrapéptido. Gracias a esta modificación lipídica, se unen a la membrana plasmática. Desde esta localización, las GTPasas monoméricas pueden desarrollar interacciones lípido-proteína y proteína-proteína generalmente con receptores de membrana o con moléculas señalizadoras acopladas a éstos, de manera que ejercen un papel fundamental en la transducción de señales.

El ciclo GDP / GTP está controlado por dos clases de proteína reguladoras: por un lado, los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) que promueven la formación de la forma activa unida a GTP (Schmidt and Hall, 2002). Por otro lado, estarían las proteínas activadoras de la GTPasa que aceleran la actividad GTPasa intrínseca promoviendo la formación de la forma inactiva unida a GDP (Bernards and Settleman, 2004). Los GEFs y GAPs que usan

las diferentes GTPasas dentro de una misma familia pueden ser iguales o distintos. Las GTPasas pertenecientes a familias diferentes suelen tener GAPs y GEFs estructuralmente distintos entre sí pero mecánicamente similares.

Los dos estados, activo e inactivo, tienen conformaciones similares con diferencias pronunciadas correspondientes a las regiones denominadas “switch I” (residuos Ras 32-38) y “switch II” (residuos 59-67). Son principalmente los cambios conformacionales en las regiones “switch” los responsables de la interacción con proteínas efectoras. Por ejemplo, al unirse a GTP, el tercer grupo fosfato de este, induce el desplazamiento de ciertos aminoácidos y la relocalización de las dos regiones “switch”, resultando así más accesible para la interacción con las proteínas efectoras (Bishop and Hall, 2000; Repasky et al., 2004).

La familia Ras

La familia Ras (oncoproteínas Ras sarcoma) está compuesta por 39 proteínas divididas a su vez en 6 subfamilias; Ras clásicas (N,K,H-Ras), R-Ras (del inglés “Ras-related”), Rap, Ral, Rheb y Rin (Wennerberg et al., 2005). Estas GTPasas comparten un alto grado de homología tanto en el extremo N-terminal, siendo especialmente evidente en el bucle de unión a fosfato (del inglés “P-loop”), y en los anteriormente comentados “switch I” y “switch II”, como en su región C-terminal, con el dominio CAAX, responsable de su unión a la membrana. Las GTPasas de la familia Ras se activan en respuesta a una amplia gama de estímulos extracelulares regulando multitud de vías de señalización intracelulares, y permitiendo a la célula reaccionar a cambios en su microambiente. Los miembros de la familia Ras están implicados en mecanismos moleculares básicos celulares como pueden ser el crecimiento y división, la diferenciación y la supervivencia. Como consecuencia, ciertas mutaciones en genes *Ras* pueden producir proteínas Ras permanentemente activas (unidas constitutivamente a GTP) que señalizan incluso en ausencia de estímulos externos. De hecho, los genes que codifican los miembros de la subfamilia Ras clásicas están frecuentemente mutados o sobreexpresados en los cánceres humanos. Esto hace que esta subfamilia haya sido ampliamente estudiada. La subfamilia R-Ras, mucho menos conocida, es la subfamilia más cercana en cuanto a homología de secuencia a las Ras clásicas.

Subfamilia R-Ras y sus miembros

La subfamilia R-Ras está compuesta por tres miembros: R-Ras1 (o R-Ras), R-Ras2 (o TC21) y R-Ras3 (o M-Ras) (Ohba et al., 2000; Colicelli, 2004; Gutierrez-Erlandsson et al., 2013). En cuanto a su estructura, las proteínas R-Ras están compuestas por unos 200 aminoácidos y aunque comparten características estructurales primarias, secundarias y terciarias con las Ras clásicas, constan de extremos amino (N-) y carboxi (C-) terminal de mayor tamaño. Las R-Ras comparten

Introducción

un 46-67% de identidad aminoacídica entre ellas y un 52-55% con las clásicas. Las proteínas R-Ras comparten identidad de secuencia completa con el dominio efector Ras (core), pero las diferencias de secuencia en el dominio de interacción con el efector explican las diferentes capacidades para interactuar con los efectores de las Ras clásicas. De hecho, esto sugiere funciones diferentes y no redundantes para las R-Ras en los diferentes tipos celulares.

Otra de las diferencias con las Ras clásicas es el tipo de modificación postraduccional al que está sometido el extremo C-terminal. Las R-Ras se modifican con isoprenoides geranyl-geranilo C20, mucho más hidrofóbicos que los isoprenoides farnesilo C15 con los que están modificadas las clásicas. Las encargadas de realizar estas modificaciones lipídicas son las enzimas geranylgeraniltransferasa I y farnesiltransferasa respectivamente. R-Ras 2 por su parte, puede ser modificada también por la encima farnesiltransferasa.

Funcionalmente, se sabe que los miembros de la subfamilia R-Ras son las únicas GTPasas de la superfamilia que al igual que las Ras clásicas tienen una alta capacidad transformante (Graham et al., 1999; Movilla et al., 1999; Cox and Der, 2002; Kimmelman et al., 2002).

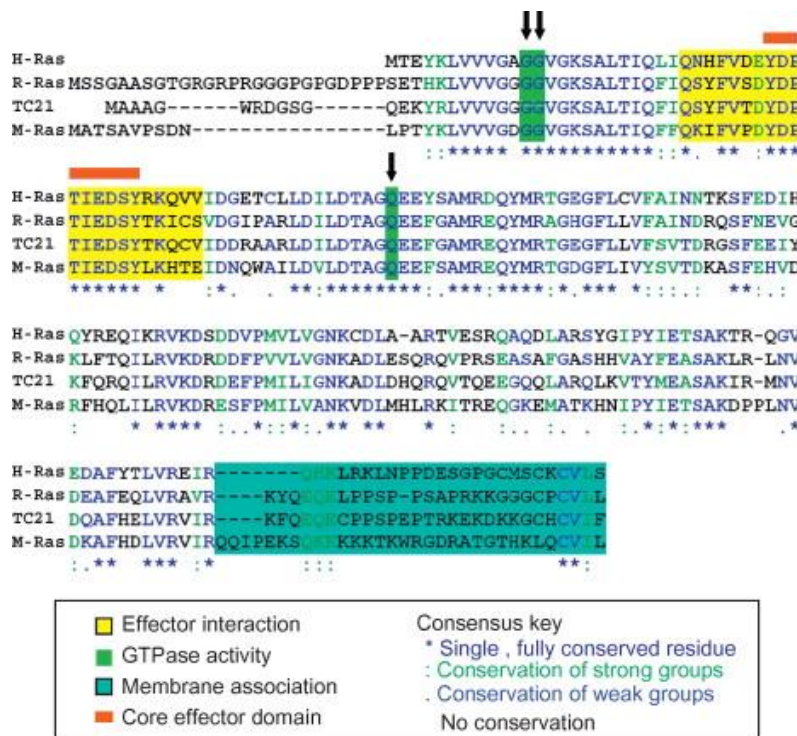


Figura 12. Comparativa entre las secuencias de los miembros de la subfamilia R-Ras y Ras clásicas. Alineadas se encuentran las secuencias de aminoácidos de los tres miembros de la subfamilia R-Ras y H-Ras de la subfamilia de Ras clásicas. (Repasky et al., 2011)

R-Ras1 (R-Ras)

El gen *R-Ras* codifica para una proteína de 218 aminoácidos y unos 23,5 kDa teóricos, con una movilidad electroforética de cerca de 25kDa, que comparte un 55% de identidad de secuencia con H-Ras, un 65% con R-Ras2 y un 46% con R-Ras3. Su expresión es ubicua, presentando los niveles más altos de expresión en tejidos como el músculo, la médula ósea, el sistema inmune, pulmones, testículos e hígado. Los tejidos con expresión moderada de R-Ras1 son el tejido adiposo y los ovarios, mientras que otros como el riñón, la vejiga y el cerebro presentan menores niveles de expresión (<https://www.proteinatlas.org>). Se ha involucrado a R-Ras1 en la estabilización de las uniones endoteliales del sistema vascular (Sawada and Komatsu, 2012; Sawada et al., 2012). En el sistema inmune, R-Ras es requerida para el tráfico de progenitores hematopoyéticos y células T, además de para la formación de la sinapsis inmunológica con las células dendríticas (Shang et al., 2011; Singh et al., 2012).

Recientemente, R-Ras1 ha sido descrito por tener un papel en la respuesta inmune desencadenada tras un proceso autoinmune. Ratones carentes de R-Ras1 fueron inducidos para padecer encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Estos ratones mostraban un curso de la enfermedad muy atenuado comparado con los ratones control. Esto era debido a que la ausencia de R-Ras1 promovía la formación de células dendríticas (DC) con bajos niveles de MHC II concomitante con un aumento en la proliferación de células T reguladoras naturales en la periferia (Ray et al., 2014).

En el SNC, R-Ras1 está implicada en el crecimiento del cono axónico de las neuronas hipocámpales, ya que su regulación a la baja induce el colapso de el mismo (Oinuma et al., 2004). Además, en axones en migración la activación de R-Ras1 parece estar controlada por la señalización vía semaforina-plexina (Iwasawa et al., 2012).

R-Ras1 es conocida por promover la señalización vía integrinas, aunque poco se sabe sobre los mecanismos moleculares subyacentes y responsables de esta señalización. A este respecto, en 2004, Olsen y French-Constant describieron *in vitro* la expresión de R-Ras1 en OLs y un posible papel en la maduración de los OPCs a OLs mielinizantes. En sus experimentos, OPCs transfectados con una forma mutante constitutivamente activa de R-Ras (38V) dio como resultado un aumento espectacular en la formación de lamelas por parte de los oligodendrocitos ya diferenciados.

Numerosos estudios han demostrado que R-Ras1 puede interactuar con 3 efectores clave: c-Raf, PI3-K, y Ral-GDS (Rey et al., 1994; Huff et al., 1997; Marte et al., 1997; Osada et al., 1999; Self et al., 2001).

R-Ras, por tanto, está implicada en funciones como crecimiento celular, adhesión, migración, invasión, crecimiento de neuritas, diferenciación, fagocitosis y tráfico de células inmunes.

R-Ras2

El gen *R-Ras2* (*TC21*) codifica para una proteína de 204 aminoácidos y unos 23.4 kDa, con una movilidad electroforética de unos 21kDa. R-Ras2 además de geranilada puede ser farnesilada como ocurre con las Ras clásicas.

Datos previos a este trabajo indican que R-Ras2 se expresa desde estadios tempranos del desarrollo hasta la madurez. Los tejidos con mayores niveles de expresión de *R-Ras2* incluyen los pulmones y testículos. Tejidos con expresión moderada serían el intestino, la vejiga, tejido adiposo blanco, ovarios y tejidos hematopoyéticos como el timo y el bazo. Otros tejidos con un nivel algo más bajo de expresión serían el corazón, la traquea, glándulas salivares, mamarias, bulbouretral, riñones, ojos, piel y cerebro. Los tejidos con niveles de expresión muy bajos serían la lengua, el hígado el tejido adiposo pardo y el músculo esquelético (Delgado et al., 2009; Larive et al., 2012) (<https://www.proteinatlas.org>).

R-Ras2 tiene una capacidad intrínseca de intercambio de guanina muy elevada (Movilla et al., 1999). R-Ras2, al igual que las Ras clásicas ha sido encontrada mutada en tumores humanos de pulmón, mama, útero, ovario (Huang et al., 1995; Barker and Crompton, 1998) y sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer como el de boca, esófago y en tumores del sistema nervioso (Clark et al., 1996; Arora et al., 2005; Sharma et al., 2005; Gutierrez-Erlandsson et al., 2013). R-Ras2 ha sido descrita por tener un papel importante en el correcto desarrollo de los ductos de la mama (Larive et al., 2012) y por su papel en la supervivencia de linfocitos B y T (Delgado et al., 2009). Los efectores conocidos que son activados por R-Ras2 incluyen a PI3K, Ral-GDS y Raf (Rosario et al., 2001). R-Ras2 activa la ruta de MAPK a través de la interacción directa con Raf, y también activa la ruta de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK).

Actualmente se sabe que R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en tejido nervioso, pero poco se sabe de los tipos celulares concretos en los que se expresan estas GTPasas.

Objetivos

OBJETIVOS

1. Identificación de la expresión *in vivo* de R-Ras1 y R-Ras2 en los OLs de los principales tractos mielinizados del SNC.

2. Estudio de la función que R-Ras1 y R-Ras2 desempeñan en los OLs.

Para ello, utilizaremos los ratones carentes de R-Ras1 (*R-Ras1^{-/-}*), R-Ras2 (*R-Ras2^{-/-}*) y de ambas proteínas (*R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*).

2.1. Estudio cualitativo y cuantitativo de la densidad de OLs presentes en los principales tractos mielinizados del SNC en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2.

2.2. Estudio del efecto de R-Ras1 y R-Ras2 en proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de los progenitores de los OLs (OPCs).

2.3. Estudio del efecto de R-Ras1 y R-Ras2 en la diferenciación y maduración de los OPCs tanto *in vivo* como *in vitro*.

2.4. Estudio de posibles mecanismos compensatorios en los ratones *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* por parte de otros miembros de la subfamilias R-Ras o Ras clásicas.

2.5. Análisis mediante técnicas de microscopía electrónica del grado de mielinización de los axones que conforman el nervio óptico en ratones *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*.

2.6. Análisis de las proteínas de la mielina en nervio óptico y cuerpo calloso de los ratones *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*.

2.7. Estudios electrofisiológicos y funcionales de visión.

3. Estudio de los mecanismos moleculares responsable de la función de R-Ras1 y R-Ras2 en OLs.

4. Estudio de la expresión de R-Ras1 y R-Ras2 en otras regiones del SNC.

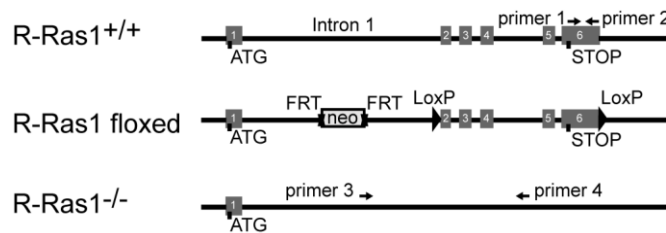
Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este trabajo, hemos utilizado animales control de la cepa C57BL/6J y animales mutantes carentes del gen *R-Ras1* (*R-Ras1^{-/-}*), *R-Ras2* (*R-Ras2^{-/-}*) y de ambos genes (*R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*).

R-Ras1^{-/-}: Estos ratones fueron generados por la compañía GenoWay (Francia). Se utilizó la construcción de “targeting” BAL1-HR que contiene un casete de resistencia a Neomicina (Neo) flanqueado por secuencias FRT que se insertan en el intrón 1 y los sitios LoxP que flanquean los exones 2 y 6 (Fig. 13). La construcción fue electroporada en células madre embrionarias de ratón (cepa 129Sv/Pas), posteriormente seleccionadas con el antibiótico análogo de la Neo (G418, Geneticina®). Para el genotipaje de los clones seleccionados se realizó primeramente una PCR en la que se verificó la recombinación homóloga del brazo 3'. Posteriormente, mediante Southern blot, se verificó tanto la recombinación homóloga del brazo 3' como el del brazo 5'. Tres de 48 clones independientes fueron positivos para la recombinación de ambos brazos. Estos fueron inyectados en blastocistos de hembras C57BL/6. Uno de ellos dio lugar a 10 crías, 7 de ellas quimeras. Una de estas quimeras resultó ser un macho con un 99% de contribución. Se cruzó dicho macho con una hembra C57BL/6 Flp, obteniendo 14 ratones con transmisión germinal verificada por una PCR dirigida a detectar la presencia del alelo modificado. Dos de las quimeras que presentaban alta contribución (98-99% de quimerismo) se cruzaron con hembras C57BL/6J-Cre para escindir la región flanqueada por las secuencias LoxP (exones 2-6), generando así, un alelo “Knock-out” constitutivo. Dos ratones de los 6 agoutí obtenidos fueron mosaico (poseían el alelo escindido y el no escindido). Estos ratones mosaico se pusieron en cruce con ratones C57BL/6 generándose 14 crías. Tras ser analizadas por PCR, cuatro de ellas fueron positivas para el alelo silvestre y el alelo escindido, albergando por tanto el alelo Knock-out en heterocigosis. Tras confirmar los resultados por Southern blot una de las crías heterocigotas se cruzó con ratones C57BL/6J para generar la colonia de ratones *R-Ras1^{-/-}* en el “Centro de Biología Molecular Severo Ochoa”. Se pusieron cruces de ratones heterocigotos para mantener la colonia. Las crías obtenidas fueron genotipadas por PCR utilizando los oligos detallados en la tabla 2.



Material es y métodos

Figura 13: Esquema de la estrategia de generación del ratón *R-Ras1^{-/-}*. Se insertó un casete Neo flanqueado por sitios FRT en el intrón 1 junto con dos sitios loxP que flanquean los exones 2 y 6. Las flechas representan la posición de los *primers* diseñados para el genotipaje.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para el genotipaje de los ratones *R-Ras1^{-/-}*

ALELO	OLIGO 5'	OLIGO 3'
<i>R-Ras1^{+/+}</i>	CGCTCTAGCTGAGCCTCTGT (Primer 1)	TACAGGGTCTTGTGGGGAAA (Primer 2)
<i>R-Ras1^{-/-}</i>	GGAGCAAGAGGAGGGAAGGAATGGG (Primer 3)	CTTCCAGAGGACTCAGTTCAATCC (Primer 4)

***R-Ras2^{-/-}*:** Estos ratones fueron generados por la compañía Lexicon Pharmaceuticals (Texas, EE. UU.). Su generación ya ha sido descrita con anterioridad (Delgado et al., 2009). De manera muy resumida: los ratones fueron derivados del clon OST361011 de células madre embrionarias con inserción del vector retroviral VICTR37 en mitad del intrón 1 de R-Ras2. Este vector retroviral, contiene a parte de otras muchas secuencias importantes para su inserción y función, la proteína de fusión β -Geo que combina el gen que codifica para la beta-galactosidasa y el que confiere resistencia a Neo (Fig. 14). Este reportero, hace posible la realización de la reacción X-Gal en los ratones *R-Ras2^{-/-}* para localizar su expresión. Ratones heterocigotos *R-Ras2^{+/-}* fueron cruzados con ratones C57BL/6J para generar la colonia de ratones *R-Ras2^{-/-}* en el “Centro de Biología Molecular Severo Ochoa”. Las crías obtenidas fueron genotipadas por PCR utilizando los oligos detallados en la tabla 3.

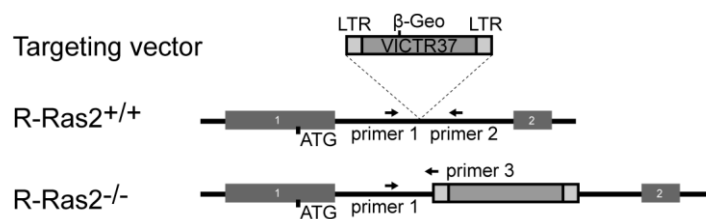


Figura 14: Esquema de la estrategia de generación del ratón *R-Ras2^{-/-}*. Ilustración del sitio de inserción retroviral del gen R-Ras2 en el intrón 1 y las posiciones de los tres *primers* utilizados para la determinación del genotipo representadas por flechas.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el genotipaje de los ratones *R-Ras2^{-/-}*

ALELO	OLIGO 5'	OLIGO 3'
<i>R-Ras2^{+/+}</i>	GGATCATGTTGTGGAGTTGTGGC (Primer 1)	GTCCAAGAAGACATGGATGGGGG (Primer 2)
<i>R-Ras2^{-/-}</i>	GGATCATGTTGTGGAGTTGTGGC (Primer 1)	AAACCCTCTTGCAGTTGCATCCG (Primer 3)

R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}: Los dobles mutantes carentes de R-Ras1 y R-Ras2 fueron generados mediante retrocruzamiento entre las líneas individuales *R-Ras1^{-/-}* y *R-Ras2^{-/-}*.

Los animales se alojaron en condiciones específicas libres de patógenos, en una habitación con humedad y temperatura controladas en un ciclo de luz / oscuridad de 12 horas, recibiendo agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el comité ético institucional correspondiente (CBMSO) y se realizaron de acuerdo con las directivas españolas y europeas. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

Los animales *R-Ras1^{-/-}* y *R-Ras2^{-/-}* fueron amablemente cedidos por el Prof. Alarcón (CBMSO). La mañana en la que aparece el tapón vaginal se define como día embrionario (E) 0,5 y los ratones recién nacidos se definen como postnatal (P) 0. Utilizamos machos y hembras indistintamente para la realización de los experimentos.

Western blot

Las diferentes muestras de tejido fueron obtenidas de forma rápida tras la eutanasia por dislocación cervical de los ratones. A lo largo de este estudio se han obtenido tejidos variados como: nervio óptico (ON), cuerpo caloso (CC), corteza (CX), hipocampo (HP), talamo-hipotalamo (THT), cerebelo (CB) y médula espinal (SC) de animales de distintas edades (de P30 a P90), se sonicaron a 4°C en tampón de lisis1 (Tabla 4). Para la detección de proteínas fosforiladas, se usó el tampón 2 (Tabla 4). Los lisados fueron desnaturalizados por ebullición durante 5 minutos en buffer de carga de proteína (Tabla 4). Se cargaron las muestras en geles de acrilamida/bisacrilamida del 10-12% en condiciones reductoras (en presencia de β-mercaptoetanol). Los geles se corrieron a corriente constante comenzando a 90 V hasta entrar en el gel separador y 100-120V a partir de entonces. Después de la electroforesis, las muestras se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) previamente activadas con MetOH durante dos minutos. La transferencia se realizó utilizando un sistema de electrotransferencia semiseco a 1,2 mA/cm² durante 35-40 min. La unión del anticuerpo a proteínas inespecíficas se bloqueó incubando la membrana en la solución de bloqueo correspondiente (tabla 4) durante 2 horas a temperatura ambiente (RT). Las membranas se incubaron durante la noche (O/N) a 4 ° C con el

Materialles y métodos

anticuerpo primario correspondiente diluido en tampón de bloqueo. Los distintos anticuerpos y sus diluciones se detallan en la tabla 5. Después de múltiples lavados con TBS-T, las membranas se incubaron durante 1 h a RT con los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con peroxidasa (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Las proteínas marcadas se detectaron con el reactivo de quimioluminiscencia ECL.

Tabla 4. Tampones y soluciones usadas en Western blot.

TAMPÓN/SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
Tampón de lisis para proteínas sin fosforilar (Tampón 1)	Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP40 al 1%, EDTA 2 mM, SDS al 0,1%, 0,5% desoxicolato, cóctel de inhibidores de proteasas comercial y fluoruro de fenilmetano sulfonilo (PMSF).	Preparación de muestras: Lisis celular para extracción de proteínas no fosforiladas.
Tampón de lisis para proteínas fosforiladas (Tampón 2)	Tris-HCl 20 mM pH 7,8, NaCl 150 mM, IOAA 10 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, Brij96 0,33%, y cocktails de inhibidores de fosfatasa y proteasas comerciales.	Preparación de muestras: Lisis celular para extracción de proteínas fosforiladas.
Geles de acrilamida/bisacrilamida: Tampón del gel concentrador	Tris 0,4 M pH 6,8, SDS 0,1%, APS 0,25%, Acrilamida/bisacrilamida 10-12%, Temed, H ₂ O Mq hasta completar volumen	SDS-PAGE
Geles de acrilamida/bisacrilamida: Tampón del gel separador	Tris 1,5 M pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,25%, Acrilamida/bisacrilamida 10-12%, Temed, H ₂ O Mq hasta completar volumen	SDS-PAGE

Tampón de carga 1x	Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 1%, EDTA 12,5 mM y azul de bromofenol al 0,02%	SDS-PAGE
Tampón de electroforesis	Tris-HCl 25mM, Glicina 0,2mM y SDS 0,1%	SDS-PAGE
Tampón de transferencia	Tris-HCl 0,2 mM, Glicina 200mM, MetOH 20%, H ₂ O MilliQ hasta completar volumen.	Transferencia
TBS y TBS-T	TBS: Tris-HCl 50 mM, NaCl 276 mM, KCl 54 mM. pH 8 TBS-T: TBS+Tween-20 0,1%	Western
Tampón de bloqueo para proteínas sin fosforilar	TBS-T con 5% de leche.	Bloqueo
Tampón de bloqueo para proteínas fosforiladas	TBS-T con 5% de suero fetal bovino (BSA).	Bloqueo

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en Western blot.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución utilizada
Conejo anti-Akt Total	Cell Signaling	# 9272	1:1000
Conejo anti-pAkt (Ser473)	Cell Signaling	# 4060	1:2000
Conejo anti-pAkt (Thr308)	Cell Signaling	# 9275	1:1000
Conejo anti Erk1/2 p44/42 MAPK total	Cell Signaling	# 9102	1:1000

Conejo anti p-Erk1/2 p44/42(Thr202/204)	Cell Signaling	# 9101	1:1000
Conejo anti-S6 total	Cell Signaling	# 2217	1:1000
Conejo anti p-S6 (S240/244)	Cell Signaling	# 5364	1:1000
Conejo anti-R-Ras	Abcam	ab154962	1:200
Conejo anti-R-Ras2	Amablemente cedido por el Prof. B. Alarcón	Descrito en (Delgado et al., 2009)	1:200
Conejo anti-Caspr	Abcam	# ab34151	1:250
Ratón anti-GAPDH (G9)	Santa Cruz	# sc-365062	1:1000
Cabra anti-MAG (C-19)	Santa Cruz	# sc-9544	1:200
Ratón anti-MBP (aa67-74)	Bio-Rad / AbD Serotec	# MCA685S	1:200
Ratón anti-R-Ras3	Abcam	Ab176570	1:1000
Ratón anti-pan Ras	Calbiochem	OP40	1:300
Ratón anti-TCF4 (clon 6H5-3)	Millipore	#05-511	1:1000
Conejo anti-Olig2	Millipore	# AB9610	1:2000
Secundario anti-Ratón IgG-HRP	Santa Cruz	SC-2005	1:5000
Secundario anti-Conejo IgG-HRP	Southern biotech	4030-05	1:5000

Inmunohistoquímica. Preparación del tejido

Los animales fueron anestesiados con una dosis muy alta de la mezcla ketamina/xilazina. Fueron fijados mediante perfusión transcardial, primero con PBS 1X frío para eliminar la sangre y posteriormente con paraformaldehído al 4%. Los tejidos perfundidos fueron extraídos y post-fijados en paraformaldehído al 4% O/N a 4°C. A la mañana siguiente se lavaban con PBS1X y se procedía a su criopreservación. Primeramente, se dejaban O/N a 4°C en una solución de sacarosa

al 30% y posteriormente eran incluidos en una solución de gelatina sacarosa. A continuación, eran congelados y preservados a -80°C. Para su utilización, se realizaban criosecciones de 15 µM en un criostato y se colocaban en portaobjetos de microscopio Superfrost Plus (Fisher Scientific). Para los cerebros adultos y P30 realizamos criosecciones más gruesas 40 µM que se conservaban a -20°C en una solución glicerolada para su posterior tinción en flotante.

Tabla 6. Tampones y soluciones usadas en Inmunohistoquímica

TAMPÓN/SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
PBS	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, KH ₂ PO ₄ 2 mM pH 7,4	Múltiples
PBS-T	PBS 1X, 0,5% Tritón X-100	Permeabilización del tejido en tinciones inmunohistoquímicas.
Tampón citrato	Citrato de sodio 10mM, H ₂ O Milliq hasta completar volumen.	Desenmascarar epítomos, facilitando así la unión del anticuerpo primario
Solución de bloqueo	PBS-T, 10% suero de caballo (Bercury et al.)	Bloqueo del tejido para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo.
Solución glicerolada	PBS 10%, Etilen glicol 30%, Glicerol 30%, H ₂ O Milliq hasta completar volumen	Preservar el tejido cortado a -20°C
Solución de sacarosa	Sacarosa 30% en PBS1X	Eliminar el agua del tejido evitando la formación de cristales.
Gelatina Sacarosa	Gelatina porcina 7,5%, Sacarosa 15%, PBS1X	Criopreservación
HCl 2 N	HCl 2N en PBS1X	Tinción de BrdU
Solución MetOH, H₂O₂	MetOH 30%, H ₂ O ₂ 10%, PBS1X 60%	Permeabilización y eliminación de las peroxidasas endógenas que dan autofluorescencia.

Inmunohistoquímica. Realización de tinciones básicas en porta

Se dejó descongelar y secar los portas durante media hora a RT. Tras un lavado de 10 minutos con PBS1X (Tabla 6) las secciones fueron en su mayoría hervidas en buffer citrato (tabla 5) durante 5 minutos a 110°C en una olla a presión. Posteriormente se dejaban enfriar a RT en su propio citrato. Después, se realizaban varios lavados en PBS1X y se incubaban durante 10-15 minutos con la solución de MetOH-H₂O₂ (Tabla 6). En el caso de la tinción con el anticuerpo anti- Caspasa3 este último paso no se llevó a cabo ya que impedía la tinción. Tras 3 lavados de 10 minutos con PBS1X se procedía a la incubación de las muestras con la solución de bloqueo (Tabla 6) durante 1-2 horas a RT. En el caso de la tinción con Nkx2.2 esta incubación se realizaba O/N a 4°C. Transcurrido el tiempo de bloqueo, las secciones eran incubadas O/N a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario (tabla 7) en solución de bloqueo. Al día siguiente, tras lavar bien las secciones con PBS-T se incubaban durante 1-2 horas a RT con los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 7) se lavaban y se incubaban 10 minutos con DAPI para marcar los nucleos. Tras un último lavado con H₂O para eliminar las sales, los portas se preservaban con unas gotas de medio de montaje Aqua-polyMount (Cat#18606; Polyscience).

Tinciones en flotante

Las tinciones en flotante se realizaron en placas de 24 pocillos. El protocolo seguido es muy similar al anterior. En este caso, sin embargo, los cortes pasaban directamente de la solución glicerolada a -20°C a PBS1X y la incubación con el buffer citrato se realizaba en una estufa a 95°C durante 10 minutos. En el caso de la tinción con el anticuerpo anti-βGal (Figura 52), no se utilizaron anticuerpos secundarios fluorescentes. En su lugar, tras amplificar la señal del anticuerpo con biotina-estreptavidina, revelamos la tinción con la solución comercial VIP® (Vector Labs). Se trata de un compuesto comercial que en presencia de peroxidasa forma un precipita de color rosado (Lanciego et al., 1997).

Tabla 7. Listado de anticuerpos utilizados en tinciones inmunohistoquímicas

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución utilizada
Conejo anti-Caspasa3-activa (Asp 175)	Cell Signaling Technology	# 9661	1:500
Ratón anti-O4	Millipore	MAB345	1:200
Ratón anti-NF200 clone NE14	Sigma-Aldrich	# N5389	1:300

Conejo anti-R-Ras	Abcam	ab154962	1:200
Conejo anti-R-Ras2	cedido por el Prof. B. Alarcón	(Delgado et al., 2009)	1:500
Conejo anti-Caspr	Abcam	# ab34151	1:250
Ratón anti-Nkx2.2*	Cedido por la Prof. Aixa Morales (instituto Cajal)	# 74.5A5	1:250
Conejo anti-MBP (aa67-74)	Abcam	# ab40390	1:300
Conejo anti-βgal	ICN Biomed-Cappel	Servicio de microscopía confocal CBMSO	1:500
Ratón anti-BrdU (clon B44)	BD	347580	1:200
Ratón anti-TCF4 (clon 6H5-3)	Millipore	#05-511	1:200
Conejo anti-Olig2	Millipore	# AB9610	1:500
Ratón anti-NeuN	Millipore	# MAB377	1:500
Ratón Anti-APC-CC1	Abcam	Ab16794	1:20
Ratón anti-Iba1	Millipore	MABN92	1:1000
Ratón anti-CNPasa	Biolegend	#SMI-91R	1:500
Secundario Alexa anti-Ratón 488,555	Invitrogen/Life Technologies	Servicio de microscopía confocal CBMSO	1:500
Secundario Alexa anti-Conejo 488,555	Invitrogen/Life Technologies	Servicio de microscopía confocal CBMSO	1:500
Secundario anti-Cabra POD	Invitrogen/Life Technologies	Servicio de microscopía confocal CBMSO	1:5000
DAPI	Sigma-Aldrich	32670	1:500

Análisis de la proliferación: Pulsos de BrdU

Las inyecciones de BrdU se administraron por vía intraperitoneal a ratonas gestantes (100 µg / g) en diferentes etapas del desarrollo embrionario. Una hora después de la administración de BrdU, se sacrificaba a la hembra y los cerebros de los embriones eran fijados O/N en PFA al 4%. La tinción para BrdU se realizó como se describe (Cubelos et al., 2008). Brevemente, tras la incubación de los portas con MetOH-H₂O₂, bien lavados con PBS1X, estos eran introducidos en un baño de HCl 2N a 37°C durante 30 minutos. Tras los correspondientes lavados y bloqueo, los portas eran incubados O/N con el anticuerpo primario (Tabla 7) anti-BrdU. Tras la incubación con los secundarios conjugados y DAPI, las secciones eran debidamente montadas y preservadas. Para su análisis, seleccionamos secciones emparejadas anatómicamente (n = 3). En el caso de las tinciones y cuantificaciones en nervio óptico, estos fueron cortados en secciones longitudinales, el área donde se realizaron los estudios se refleja en la figura 15. Todas las cuantificaciones fueron realizadas tras la toma de fotos en secciones comparables de los ratones controles y los mutantes. Para el conteo exhaustivo de cada una de las células positivas se utilizó el software Image J. No se midió intensidad de fluorescencia en ningún caso.

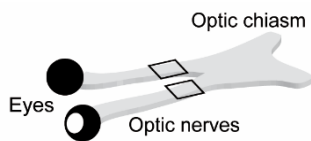


Figura 15: Esquema del tracto óptico. Los recuadros indican el lugar donde se llevaron a cabo los diferentes estudios.

Tinción con azul de toluidina.

En este caso, las secciones se realizaron con un micrótopo de cuchilla vibratoria Leica VT1200 S (100 µm), se lavaron 10 min en PBS y se tiñeron durante 1 minuto con 200 µl de azul de toluidina al 0,1%. Finalmente se lavaron con agua destilada y etanol durante 30 segundos. Las imágenes fueron tomadas con una lupa Leica MZ6 para la ubicación correcta de los electrodos de registro implantados.

Reacción de X-Gal

Para las tinciones con el reactivo X-Gal, utilizamos tejido fresco, por lo tanto, no perfundimos los animales ni fijamos las estructuras. Tras la eutanasia de los animales, los cerebros fueron lavados con PBS1X y montados en agarosa para facilitar su orientación y corte con un vibratomo. Se hicieron secciones gruesas (~300-400 micras) que se sometieron a la reacción X-Gal a 37°C

durante 4 horas u O/N. En esta reacción, el reactivo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) es hidrolizado por la β -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol. Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. Posteriormente se fijaron con PFA 4% y se fotografiaron en una lupa Leica MZ6.

Microscopía electrónica

Para este experimento se utilizaron ratones control y mutantes de la misma camada, procedentes de cruces heterocigotos. Conociendo su genotipo, se anestesiaron en la edad adulta (P90) y se perfundieron intracardiamente con PFA al 4% y glutaraldehído al 2,5% en PBS 0,1 M. Los nervios ópticos fueron extraídos y tratados con el mismo fijador O/N a 4°C. Tras varios lavados en PBS, los nervios ópticos se fijaron con 1% de tetróxido de osmio en agua doblemente destilada y 1% de ferrocianuro de potasio 1 hora a 4 °C. Después de tres lavados con agua bidestilada, se trataron con ácido tánico al 0,15% en PBS (0,1 M pH 7,4) y se tiñeron en bloque con acetato de uranilo al 2% en agua destilada durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Los nervios ópticos se lavaron 3 veces con agua doblemente destilada y se deshidrataron en una serie ascendente de diluciones de etanol hasta llegar al 100%, todo a 4 °C. La siguiente infiltración se realizó con óxido de propileno: EtOH (1: 1; v: v) durante 5 minutos, óxido de propileno 3 veces durante 15 minutos cada uno, óxido de propileno: Epon (1: 1) (resina epoxi TAAB 812, laboratorios TAAB, Berkshire, Inglaterra) 45 min, 100% Epon 1 h, 100% Epon O/N. La encapsulación se realizó en moldes planos donde los nervios ópticos se orientaron correctamente y luego se polimerizaron 48 horas a 60 °C. Las secciones semifinas (1 μ m) se tiñeron con azul de toluidina. El nervio óptico se cortó en secciones de 70-80 nm en un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT) con una cuchilla de diamante (DIATOME) y se recolectó en rejillas de boutonniere Cu-Pd cubiertas por Formvar. La tinción de las secciones ultrafinas se realizó mediante gotas de acetato de uranilo acuoso al 2% durante 7 minutos seguido de citrato de plomo de Reynolds durante 2 minutos. Los análisis ultraestructurales se realizaron con un microscopio electrónico JEM-1010 (Jeol). Es importante destacar que las secciones transversales de nervio óptico se realizaron a partir de 1mm desde el epitelio pigmentario, evitando así las 170-180 micras de lámina glial (región en la que los axones no están mielinizados) (Rivella et al., 2003; Sun et al., 2009). Para el análisis de g-ratio, se tomaron doce imágenes a lo largo de la sección que cubre todo el diámetro del nervio óptico utilizando una cámara CMOS 4K x 4K, F416 de TVIPS (Gauting). De estas imágenes, seis en perfectas condiciones que coincidían en el mutante y el control, se usaron para medir el grosor de la vaina de mielina de los axones del nervio óptico utilizando como parámetro el g-ratio (Fig. 16). Se analizaron todos los axones presentes en toda la imagen (alrededor de 800-1000 axones por genotipo). Para cuantificar el número de fibras que

atraviesan el cuerpo calloso, se tomaron imágenes en el cuerpo calloso medial que cubre todo su ancho, y se cuantificó el número total de axones. Se analizaron tres animales por genotipo (n=3).

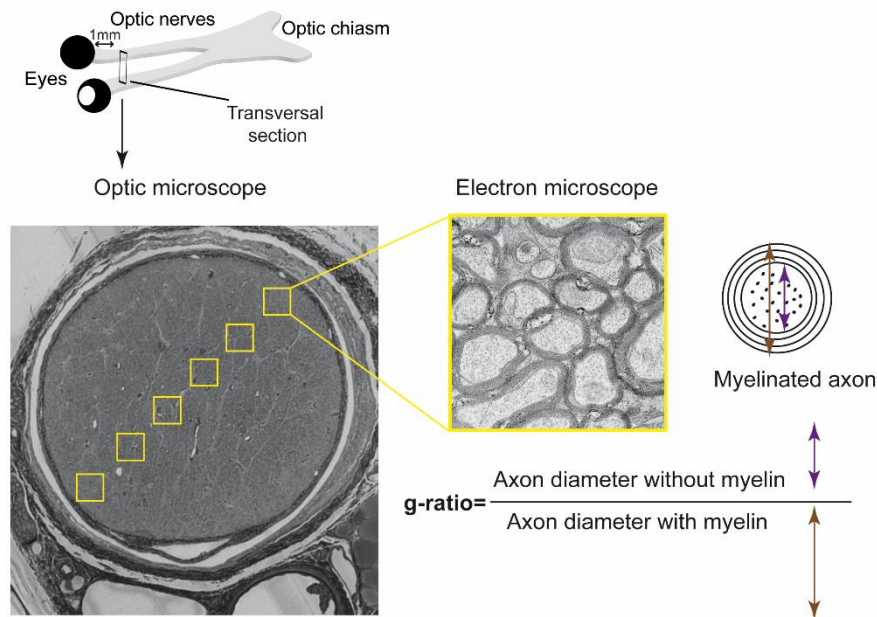


Figura 16. Microscopía electrónica. Esquema que detalla donde se hicieron los cortes semifinos (1µm) para asegurar la correcta orientación de los nervios mediante microscopio óptico, a partir de 1mm desde el epitelio pigmentario. Los ultrafinos (70-80nm) se analizaron al microscopio electrónico. Se escogieron 6 fotos de las 12 realizadas a lo largo de todo el nervio óptico y se analizaron en todos los genotipos. Para calcular el g-ratio se midió el diámetro del axón sin y con mielina, haciéndose posteriormente la relación.

Cultivos primarios de OPCs y diferenciación de OLs in vitro

Los OPCs se obtuvieron de la corteza de ratones P1 control y *R-Ras1^{-/-}*; *R-Ras2^{-/-}*, siguiendo un protocolo adaptado por el laboratorio de Fernando de Castro para el aislamiento de OPCs por agitación (McCarthy and de Vellis, 1980; Molina-Holgado et al., 2002; Medina-Rodríguez et al., 2013; Murcia-Belmonte et al., 2014).

Los OPCs purificados se colocaban en cubres de 12 mm pretratados con 10 µg/ml de poli-L-lisina (N.º P2636; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.) en tampón de borato 0,1 M (pH 8,5) y tratados con laminina (10 µg/ml) (L2020; Sigma-Aldrich) el mismo día de la siembra. Se sembraban 20000 células por pocillo y se les añadía medio de diferenciación cuya composición fue anteriormente descrita (Casaccia-Bonnel et al., 1997) (Tabla 8). Después de 14 días in vitro (DIV) diferenciándose, los OL resultantes eran fijados con PFA al 4% durante 20 min. Tras lavarlos bien, se procedía a la tinción inmunohistoquímica de los mismos: los OLs se colocaban

en PBS- T (Tabla 6) durante 20 minutos. Posteriormente se dejaban en solución de bloqueo (Tabla 6) durante 30 minutos. Después de eso, se incubaban durante 2 h a RT con los anticuerpos primarios anti-CNPasa y anti-Olig2 (Tabla 7). Después del lavado, las células se incubaban durante 35 minutos con anticuerpos secundarios fluorescentes (Alexa 488, 555) y DAPI. Los OLs obtenidos de tres experimentos diferentes se clasificaron según sus morfologías en dos grupos diferentes (Kremer et al., 2009), uno donde el número y la complejidad de los procesos era muy bajo (procesos simples) y otro donde los procesos tenían un alto grado de arborización (procesos complejos).

Tabla 8. Composición del medio de diferenciación de OPCs a OLs

COMPUESTO	CASA	REFERENCIA	CONCENTRACIÓN
BME	Gibco	41010	50%
F12	Gibco	21765	50%
Holo-Transferrina	Sigma	T0665	100µg/ml
Putrescina	Sigma	P5780	20µg/ml
Progesterona	Sigma	P6149	12,8ng/ml
Selenito de Sodio	Sigma	S5261	10,4ng/ml
Insulina	Sigma	I1882	25µg/ml
T4	Sigma	T1775	0,8µg/ml
L-Glutamina	Gibco	25030	6,6mM
Mezcla antimicrobiana	Sigma	Servicio CBMSO	100U/ml de penicilina, 0,1mg/ml de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina B
D(+)-Glucosa	Sigma		0,6%

RT-qPCR

El ARN se extrajo de diversos tejidos de ratones control, *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} usando el kit RNeasy de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen Cat # 74134). El ARN se transcribió de forma inversa usando hexámeros aleatorios y la transcriptasa inversa SuperscriptIII (*Superscript III First Strand Synthesis Supermix for qRT-PCR, no amperase UNG, Cat. No. 11752-250, Thermofisher*), según las instrucciones del fabricante. El ADN codificante (ADNc) se amplificó utilizando el termociclador BioRadC FX 384 y Eva Green Sso Fast

(BioRad), Power Sybr Green o Taqman Master Mix. Se usaron los siguientes *primers*: para R-Ras1 (R-Ras-FW sentido 5'-AAGGCAGATCTGGAGAACCA-3', R-Ras-RV antisentido 5'-TGCCTCATCGACATTCAGAC-3'), para R-Ras2 (R-Ras2-FW sentido 5'-CGTGATGAGTTTCCCATGATT-3', R-Ras2-RV antisentido 5'-TAACTGCTGCCCTTCTTCCT-3'). Todos los *primers* fueron diseñados para abarcar al menos un intrón. Los niveles de expresión se normalizaron a la expresión de GAPDH, ActB, HPRT1, 18S, TBP, ARBP y GUSB, y los cambios (*fold-changes*) se calcularon dividiendo la expresión normalizada en el control (valor 1) por la de *R-Ras1*^{-/-} o *R-Ras2*^{-/-}. Los datos de qPCR se analizaron con el software GenEx Professional 5.3.7 (MultiD).

Electrofisiología.

Ratones control (n = 9), *R-Ras1*^{-/-} (n = 13), *R-Ras2*^{-/-} (n = 13) y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} (n = 14) fueron preparados para el registro de potenciales de campo evocados por estímulo (destellos de luz) en el núcleo geniculado lateral. Para esto, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral al 4% y se les implantaron estereotáxicamente dos electrodos de registro en la parte dorsal del núcleo geniculado lateral (2.2-2.5 mm posterior al bregma, 2.0 mm lateral a la línea media y profundidad de -2.5 mm desde el cerebro superficie (Paxinos y Franklin, 2013). Los electrodos se fabricaron con alambre de tungsteno recubierto con teflón de 50 µm (Advent Research Materials). Se fijaron dos cables desnudos de plata al cráneo como tomas de tierras. Los electrodos se conectaron a un conector de 4 pines (RS-Amidata) que posteriormente fue fijada con cemento dental al hueso craneal. Después de la cirugía, los animales se mantuvieron durante 5 días en jaulas independientes con acceso libre a alimentos y agua para una recuperación adecuada. La estimulación lumínica se realizó mediante una lámpara de arco de xenón ubicada a 30 cm delante de los ojos de los animales y duró ~ 1 ms (estimulador físico, Cibertec). Para las grabaciones, cada ratón con comportamiento de alerta (*alert behaving mouse*) se colocó en una caja transparente (5 x 5 x 5 cm), en oscuridad durante >30 minutos para su adaptación y fue estimulado con un total de 20 estímulos a una velocidad de 3 por min. Esta caja estaba en el centro de una pared más grande (30 x 30 x 30 cm) cubierta con aluminio pulido. Las estimulaciones fóticas se activaron a partir de un estimulador programable CS-20 (Cibertec). Cada animal recibió dos sesiones de estimulación.

Análisis estadístico.

Los datos cuantitativos se presentan como la media ± desviación estándar (DE). Los grupos experimentales se compararon usando una prueba t de Student de dos colas. Los datos numéricos

estadísticos se proporcionan en las leyendas. (*) significa $p < 0.05$; (**) significa $p < 0.01$; (***) significa $p < 0.001$.

Resultados

RESULTADOS

Bloque I. Función de R-Ras1 y R-Ras2 en oligodentrocitos

1. R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en OLs

1.1. R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en los principales tractos mielinizados del SNC

R-Ras1 se expresa en SNC, tanto en neuronas como en OLs (Ivins et al., 2000; Negishi et al., 2005; Olsen and Ffrench-Constant, 2005; Oinuma et al., 2007; Iwasawa et al., 2012), y parece desempeñar un papel esencial en la morfología de los mismos *in vitro*. Por lo tanto, decidimos estudiar si, *in vivo*, R-Ras1 y su homólogo R-Ras2, se expresaban en los tractos mielinizados del SNC. El nervio óptico es el tracto más mielinizado del SNC, contando con alrededor de un 90% de axones mielinizados (Bartsch et al., 1997) mientras que, el cuerpo calloso cuenta con menos del 30% de axones mielinizados (Sturrock, 1980). Por ello, hemos centrado nuestro estudio principalmente en el nervio óptico. Realizamos estudios de Western blot de lisados de nervio óptico (Fig. 17A), cuerpo calloso (Fig. 17B) y médula espinal (Fig. 17C) de ratones adultos (P90). Incubamos las membranas con los correspondientes anticuerpos anti R-Ras1 y anti R-Ras2 y pudimos observar que, dada la alta homología entre R-Ras1 y R-Ras2, los anticuerpos contra estas GTPasas reconocen ambas proteínas. Aun así, pudimos detectar fácilmente dos bandas de diferentes pesos moleculares: una banda de 25 kDa correspondiente a R-Ras1 (Iwasawa et al., 2012) y una banda de 21 kDa correspondiente a R-Ras2 (Sanz-Rodríguez et al., 2018), no observándose ninguna banda en los dobles mutantes (carentes de R-Ras1 y R-Ras2). Por ello, podemos afirmar que estos anticuerpos reconocen específicamente a R-Ras1 y R-Ras2 (Fig. 17A-C). Además, los mutantes simples nos permitieron confirmar inequívocamente que la banda con un peso molecular algo mayor correspondía a R-Ras1 (presente por tanto sólo en el control y en el *R-Ras2*^{-/-}) y que la banda con peso molecular algo menor correspondía a R-Ras2 (presente únicamente en el control y en *R-Ras1*^{-/-}) (Fig. 17A). Por tanto, podemos concluir que R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en los principales tractos mielinizados del SNC de ratones adultos.

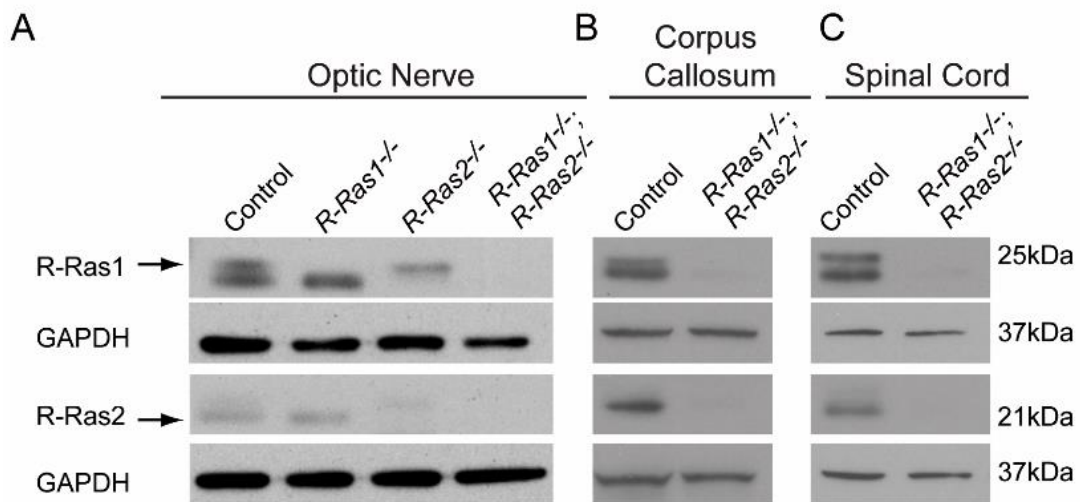


Figura 17. R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en los principales tractos mielinizados del SNC. **A**, Estudios de Western blot de lisados de nervio óptico de ratones adultos (P90) controles, *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}* que muestran la expresión de R-Ras1 y R-Ras2 en este tracto. Las membranas fueron incubadas con dos anticuerpos diferentes que reconocen ambas proteínas. La banda más pesada (~25kDa) corresponde a R-Ras1, ya que sólo se observa en el control y en el mutante carente de R-Ras2. La banda más ligera (~21kDa) corresponde a R-Ras2. No se observan bandas en el doble mutante, confirmando así la especificidad de ambos anticuerpos. **B-C**, Western blot de lisados de cuerpo calloso (**B**) y médula espinal (**C**) de ratones adultos (P90) controles, y *R-Ras1^{-/-}*; *R-Ras2^{-/-}* que demuestran la expresión de R-Ras1 y R-Ras2 en estos dos tractos mielinizados. n=3.

1.2. R-Ras1 y R-Ras2 son expresados por los OLs en el SNC

Una vez comprobado que estas GTPasas se expresaban en los principales tractos mielinizados del SNC, quisimos saber si eran los OLs, las células que expresaban estas proteínas. Para comprobar esta hipótesis realizamos dobles tinciones inmunohistoquímicas con los anticuerpos anti R-Ras1 o R-Ras2 y Nkx2.2, un factor de transcripción homeobox marcador de células oligodendrogiales (Qi et al., 2001), en secciones longitudinales de nervio óptico de ratones adultos (P90). Estas tinciones demostraron que la oligodendroglia del SNC expresa tanto R-Ras1 (como ya había sido descrito *in vitro* por Olsen y ffrench-Constant en 2005) como R-Ras2 (Fig. 18). Por tanto, describimos por primera vez la expresión *in vivo* de R-Ras1 y R-Ras2 en OLs.

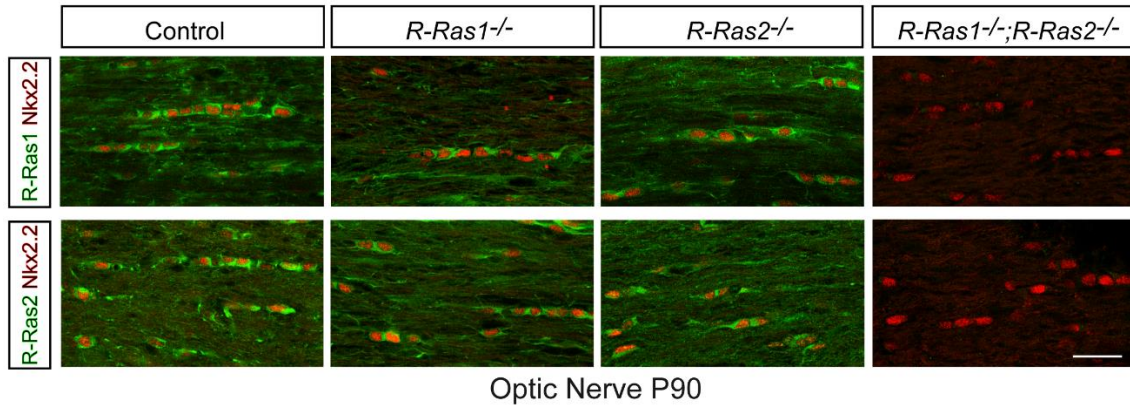


Figura 18. La oligodendroglia del SNC expresa tanto R-Ras1 como R-Ras2. Tinción inmunohistoquímica realizada en cortes longitudinales de nervio óptico de ratones adultos (P90), controles, *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}* incubadas con el anticuerpo anti R-Ras (verde), con anti R-Ras2 (verde) y con un marcador de oligodendroglia, anti Nkx2.2 (rojo). Se demuestra la expresión de ambas GTPasas en este tipo celular. No se encuentra marcaje en el doble mutante, confirmando de nuevo la especificidad de ambos anticuerpos por R-Ras1 y R-Ras2 exclusivamente. n=3. Barra de escala: 25µm.

2. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para mantener la población oligodendrocitaria de los principales tractos mielinizados del SNC

Para estudiar la función de R-Ras1 y R-Ras2 en OLS, recurrimos a los ratones mutantes carentes de R-Ras1 (*R-Ras1^{-/-}*), de R-Ras2 (*R-Ras2^{-/-}*) y de ambas (*R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*). Realizamos tinciones inmunohistoquímicas en secciones longitudinales de nervios ópticos de ratones adultos (P90), control, *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}*. Identificamos el linaje oligodendroglial mediante el factor de transcripción Olig 2 (Fig. 19A, B). El examen inmunohistológico reveló una disminución en la densidad de células oligodendrogiales en *R-Ras1^{-/-}* ($19,1 \pm 7,5\%$ de reducción, $p = 0,02$), *R-Ras2^{-/-}* ($33,5 \pm 2,1\%$ de reducción; $p < 0,0001$) y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}* ($42,8 \pm 11,8\%$ de reducción, $p = 0,003$) en comparación con los controles (Fig. 19A, C). En comparación con *R-Ras1^{-/-}*, la reducción de la población oligodendrocitaria fue mucho más dramática en los dobles mutantes ($p = 0,02$), seguida de la reducción encontrada en *R-Ras2^{-/-}* ($p = 0,003$) (Fig. 19C). De igual manera, realizamos las mismas tinciones en otros tractos mielinizados del SNC, confirmando la reducción en la población oligodendroglial en los ratones doble mutantes comparados con los controles ($38 \pm 15,6\%$ de reducción en cuerpo calloso, $p < 0,0001$; y $27 \pm 6,1\%$ de reducción en la médula espinal, $p = 0,007$; imágenes no mostradas).

Resultados

Estas observaciones mostraron que en ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 se produce una disminución en la población de OLs en los principales tractos mielinizados del SNC.

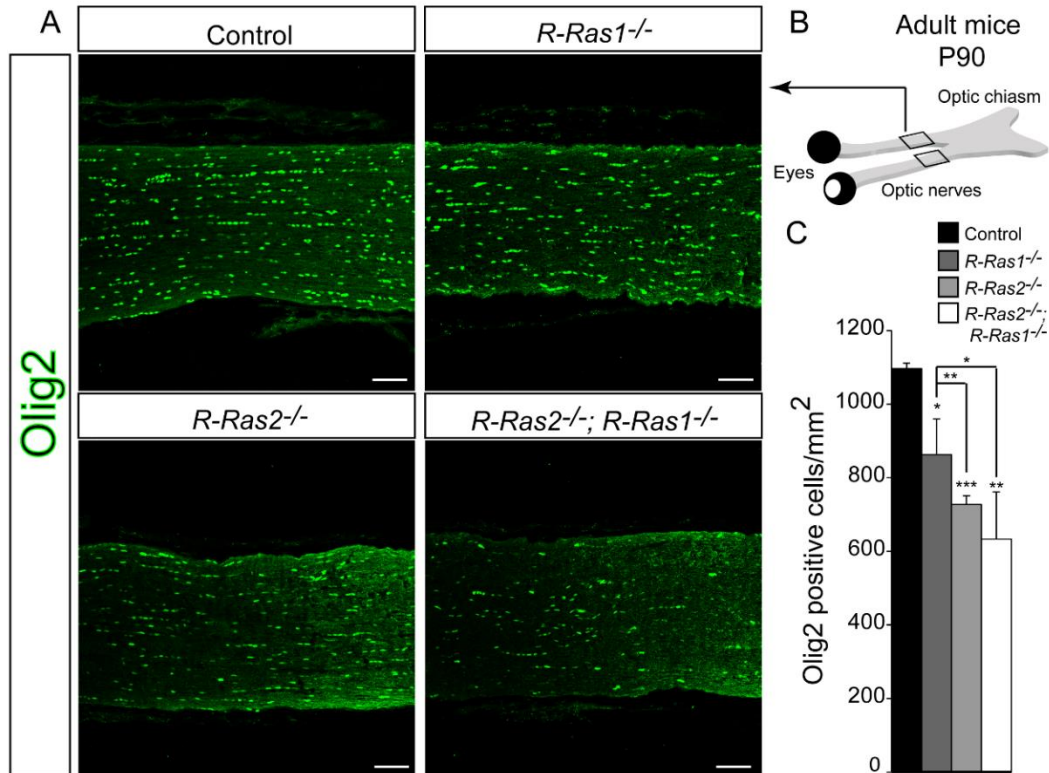


Figura 19. La falta de R-Ras1 y/o R-Ras2 conlleva una disminución en la población de oligodendrocitos presentes en el nervio óptico. **A**, Tinción inmunohistoquímica realizada en cortes longitudinales de nervios ópticos de ratones adultos P90 control, *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} utilizando el anticuerpo anti-Olig2 (verde). Se puede apreciar en las imágenes representativas una reducción en la población de OLs en los ratones mutantes comparados con los ratones control. **B**, Esquema simplificado del tracto visual que muestra con recuadros la zona en la que se realizó el análisis. **C**, Cuantificación de la densidad de células Olig2-positivas por mm² presentes en los distintos nervios ópticos. Se observa una disminución del 19,1±7,5% en los ratones *R-Ras1*^{-/-} (p=0,02), una disminución del 33,5±2,1% en el *R-Ras2*^{-/-} (p<0,0001) y una disminución del 42,8±11,8% en los ratones dobles mutantes (p=0,003) comparados con los controles. El gráfico muestra la media y la desviación estándar para el número de células Olig2-positivas por mm² de seis experimentos diferentes (n=6). Barra de escala: 75µm

3. R-Ras1 y R-Ras2 no están implicados en la generación, la proliferación ni la migración de los OPCs

Sabiendo que en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 se produce un descenso de la población de OLs en los principales tractos mielinizados del SNC, nos preguntamos si estas GTPasas podrían estar afectando a la génesis, a la migración o a la proliferación de los OPCs explicando así, la reducción de OLs observada en los ratones adultos carentes de R-Ras1 y R-Ras2. Concretamente, para el estudio de la génesis y migración de los OPCs que van a colonizar el nervio óptico, realizamos cortes coronales de embriones en los días E13 y P0 (Fig. 20A). Realizamos tinciones inmunohistoquímicas con anti Olig2 y cuantificamos el porcentaje de OPCs presentes en el suelo del tercer ventrículo, no encontrando diferencias significativas en los dobles mutantes comparados con los controles (Fig. 20A, C). Tampoco se observaron diferencias en la génesis en otras regiones, ni alteraciones en la migración de los OPCs. Estos datos indican que la disminución de la población oligodendrocitaria no es debida a una menor génesis de OPCs ni a defectos en su migración. Para estudiar si R-Ras1 y R-Ras2 podían estar implicadas en la proliferación de las células oligodendrogliales, realizamos marcages de 1 hora con BrdU a ratones dobles mutantes y controles a distintos estadios (E13, E18,5 y P0) y cuantificamos el número de células BrdU/Olig2-positivas, no encontrando diferencias significativas entre los dobles mutantes y los ratones control (Fig. 20B, D). Por todo ello concluimos que R-Ras1 y R-Ras2 no están implicados en la génesis, proliferación ni en la migración de los OPCs.

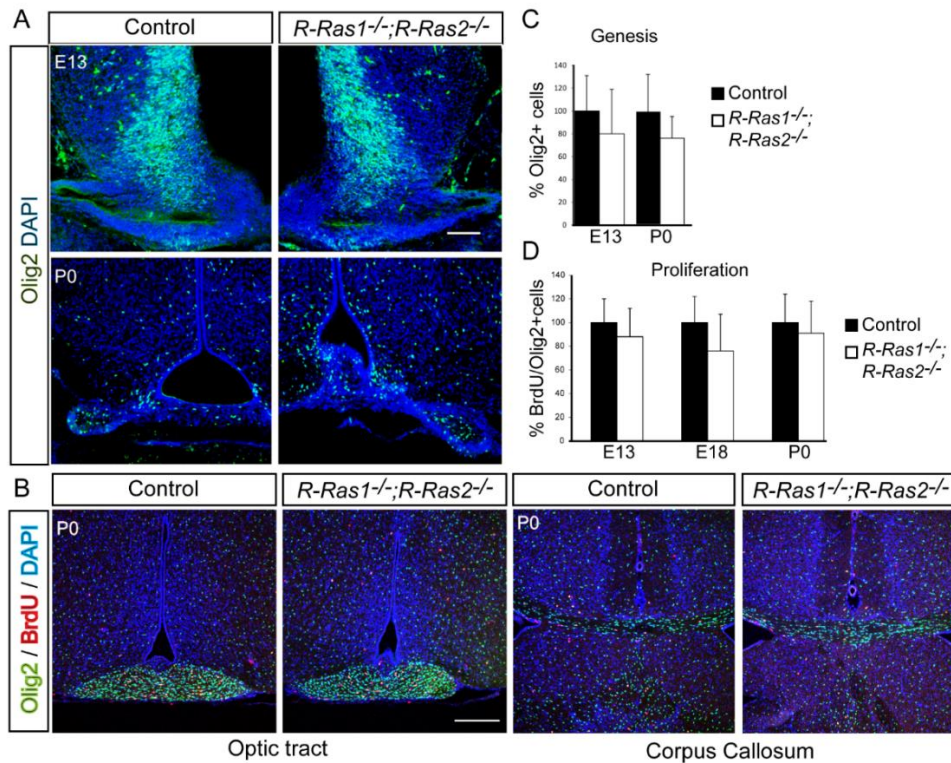


Figura 20. La génesis de OPCs no se ve afectada en ausencia de *R-Ras1* y *R-Ras2*. **A**, Secciones coronales de cerebro de embriones E13 y posnatales P0 teñidos con anti Olig2 (verde). **B**, Secciones coronales de ratones P0 teñidos con anti Olig2 (verde), anti BrdU (rojo) en el suelo del tercer ventrículo y a la altura del cuerpo caloso en desarrollo. **C**, La cuantificación del número de células Olig2 positivas presentes en el suelo del tercer ventrículo de los ratones doble mutantes comparados con los controles mostraron que no hay diferencias significativas en la generación de OPCs en los ratones *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} (E13: control 100±35, *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 80±40, p=0,56; P0: control 100±36 *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 78,5±12, p=0,42). **D**, La cuantificación del número de células en división (BrdU positivas) en relación al número de células oligodendrogliales totales (Olig2 positivas) no mostro diferencias en los ratones dobles mutantes comparados con los controles. (E13: control 100±20, *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 90±19, p=0,37; E18: control 100±20, *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 78±27, p=0,89; P0: control 100±20, *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 92±18, p=0,67). Las gráficas muestran la media y la desviación estándar del porcentaje de células Olig2-positivas (C) y de células BrdU/Olig2 positivas (D). n=3.

4. La ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 provoca un aumento en la apoptosis de las células oligodendrogliales a P30

Por otro lado, quisimos estudiar si, R-Ras1 y R-Ras2 podían estar implicados en la supervivencia de las células oligodendrogliales. A P30, el periodo de mielinización activa ya ha terminado y de manera fisiológica, muchos de los OLs que no han establecido el contacto apropiado con el axón sufren apoptosis (Barres et al., 1992; Butts et al., 2008). Para analizar si la apoptosis podría ser la causa de la menor población de OLs observada, realizamos cortes longitudinales de nervio óptico de ratones *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} y controles a día postnatal P30 y realizamos tinciones inmunohistoquímicas con un anticuerpo anti-Caspasa3-activa. Las tinciones inmunohistoquímicas con anti-caspasa3-activa revelaron que en ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 sufren apoptosis hasta 4 veces más células que en los ratones control (Fig. 21A, B) siendo esta la causa del menor número de OLs presentes en los tractos mielinizados de los ratones adultos carentes de R-Ras1 y/o R-Ras2. Por lo tanto, consideramos que R-Ras1 y R-Ras2 son necesarios para el mantenimiento de la supervivencia de los OLs.

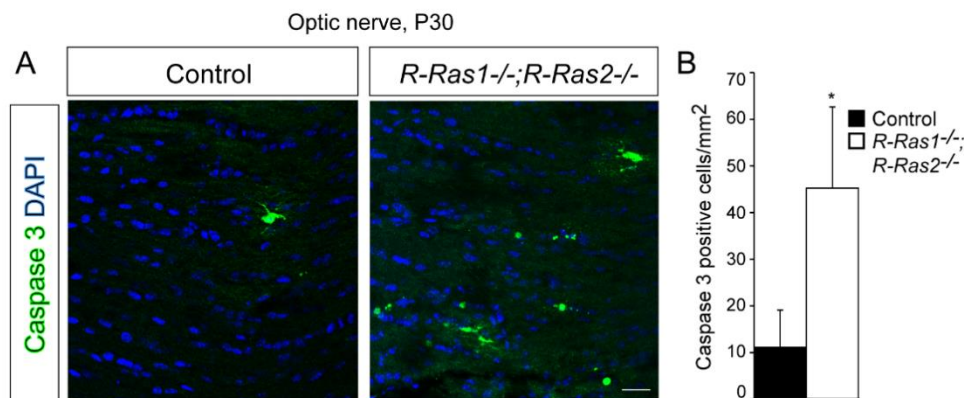


Figura 21. La ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 provoca un aumento en la apoptosis de las células oligodendrogliales a P30. **A**, Tinciones inmunohistoquímicas de secciones longitudinales de nervio óptico a P30 con anti-caspas3-activa que muestran un aumento en el número de células apoptóticas en ratones *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} comparados con los controles. **B**, La gráfica muestra la media del número de células caspasa 3-activa positivas por mm² observadas en los nervios ópticos de ratones P30 *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} (45,28±17,39 células Caspasa3⁺/mm²) comparados con los controles (11,14±8,01 células Caspasa3⁺/mm², p=0,0124; n=3). Barra de escala=25 µm.

5. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para una correcta mielinización.

5.1. La expresión de las proteínas típicas de la mielina está disminuida en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2

Dada la reducción de la población de OLs observada en los ratones carentes de R-Ras1 y/o R-Ras2, quisimos determinar si la cantidad de mielina se encontraba afectada. Para ello, llevamos a cabo una serie de análisis histológicos utilizando secciones coronales de cerebros adultos (P90). Los ratones *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} mostraron una reducción significativa y muy acusada de la anchura del cuerpo caloso en comparación con los controles (Fig. 22A). La cuantificación reveló una disminución en el grosor promedio del cuerpo caloso en el doble mutante ($168 \pm 11,5 \mu\text{m}$) en comparación con los controles ($360 \pm 44,5 \mu\text{m}$, $p < 0,0001$; Fig. 22B). Como no existía una reducción en el número de axones que formaban este tracto (3705 ± 943 axones en ratones control y 4377 ± 1137 axones en *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-}), esta reducción de su grosor, parecía reflejar un déficit en la cantidad de mielina en los ratones mutantes.

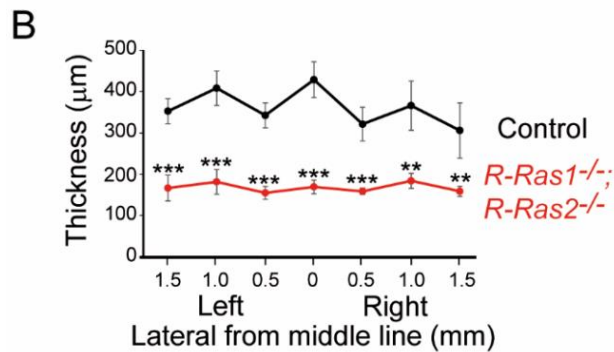
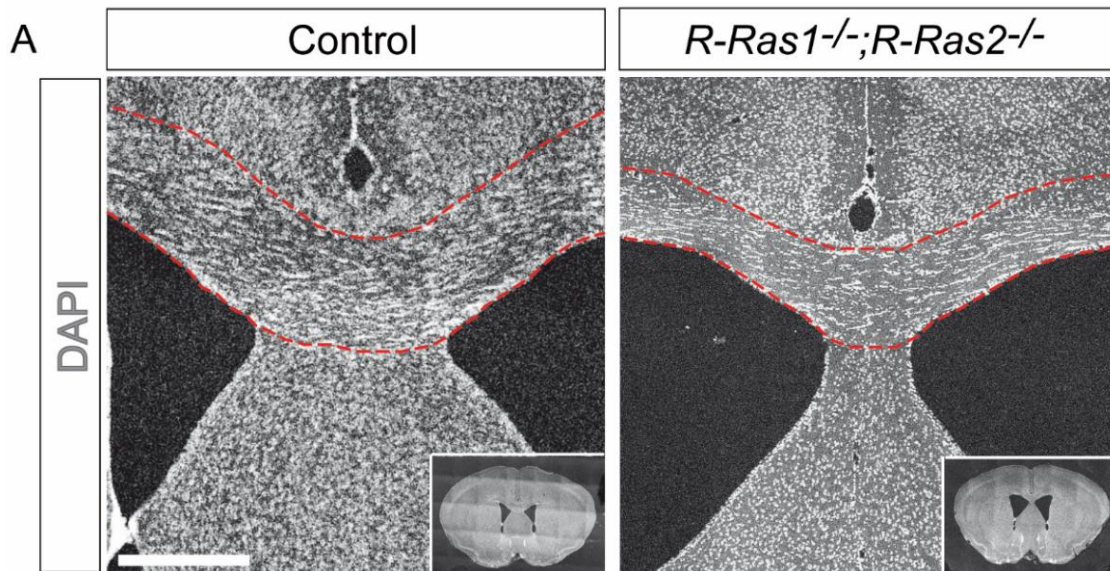
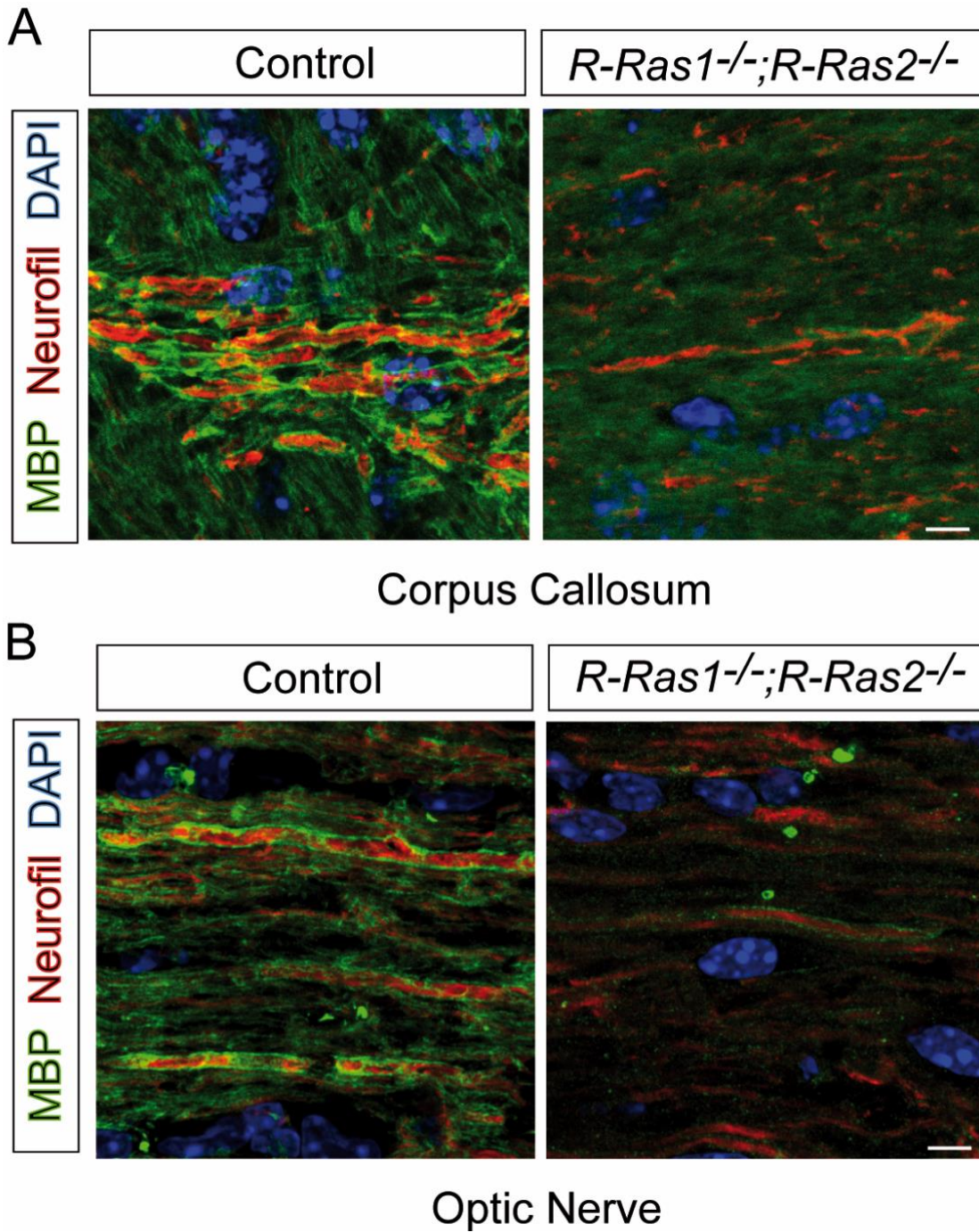


Figura 22. Reducción de la anchura del cuerpo caloso en ausencia de R-Ras1 y R-Ras2. **A**, Secciones coronales de cerebros de ratones adultos (P90) teñidos con DAPI muestran una reducción notable en el grosor del cuerpo caloso en el doble mutante en comparación con el control. Imágenes a menores aumentos del cuerpo caloso mostradas en el inserto indican las coordenadas donde se llevó a cabo el análisis (interaural 4,40-4,76 mm y bregma 0,61-0,97 mm; (Paxinos and Franklin 2013)). **B**, La cuantificación del grosor del cuerpo caloso en estas secciones coronales muestra una disminución en *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} en comparación con el control. El espesor del cuerpo caloso se analizó en varias posiciones: la posición 0 en el eje x significa medición en la línea media (*R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 169,7 ± 16,5 μm, control 428,6 ± 43,1 μm, p <0,0001); la posición 0,5 es una medida en la corteza cingulada (*R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 158,7 ± 7,8 μm, control 321,3 ± 40,7 μm, p = 0,0002 en la derecha, *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 155,1 ± 15,8 μm, control 342,4 ± 30,2 μm, p <0,0001 en la izquierda); la posición 1 es una medición en la corteza motora secundaria (*R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 184,3 ± 18,2 μm, control 365,9 ± 59,5 μm, p = 0,0011 en la derecha, *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 181,8 ± 29,9 μm, control 408,2 ± 41,6 μm, p <0,0001 en la izquierda); la posición 1.5 es una medida en la corteza motora primaria (*R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 158,9 ± 12,3 μm, control 305,9 ± 66,8 μm, p = 0,005 a la derecha, *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 166,7 ± 31,2 μm, control 352,5 ± 30,3 μm, p <0,0001 a la izquierda).

Para comprobar el estado de la mielina en los ratones *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} realizamos tinciones inmunohistoquímicas con anti-MBP (anticuerpo contra la proteína básica de la mielina) en cortes coronales de cuerpo caloso y cortes longitudinales de nervio óptico de ratones adultos (P90) *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} y controles. Las tinciones revelaron una drástica reducción de la cantidad de mielina que envuelve a los axones en los dobles mutantes (Fig. 23A, B).



*Figura 23. Reducción de la cantidad de mielina que rodea a los axones en los ratones dobles mutantes. A-B, Dobles tinciones inmunohistoquímica de secciones longitudinales de cuerpo calloso adulto (P90) (A) y de nervio óptico (B) con anti-MBP y anti-NF200 (rojo) que revelan las deficiencias de mielina encontradas en los ratones *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}* comparados con los controles. n=3. Barra de escala: 500µm para A y 5µm para C y D.*

Estas diferencias fueron cuantificadas mediante técnicas de Western blot de lisados de nervio óptico y cuerpo calloso de ratones adultos (P90) con anticuerpos contra MAG y MBP (Fig. 24A). Pudimos comprobar que en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2, estas proteínas disminuyen significativamente (en el cuerpo calloso: MAG *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 72,48 ± 15,91% (p = 0,004); MBP *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 44,52 ± 20,53% (p <0,0001). En el nervio óptico: MAG *R-Ras1*^{-/-} 72,89 ± 13,29% (p = 0,0083), *R-Ras2*^{-/-} 63,65 ± 9,45% (p = 0,0026), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 52,82 ± 13,19% (p = 0,0035); MBP *R-Ras1*^{-/-} 69,24 ± 18,41% (p = 0,0057), *R-Ras2*^{-/-} 56,36 ± 20,54% (p = 0,0014), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 43,47 ± 19,03% (p = 0,00016) (Fig. 24 A,B,C), acorde con el déficit de mielina observado en las tinciones inmunohistoquímicas (Fig. 23A, B).

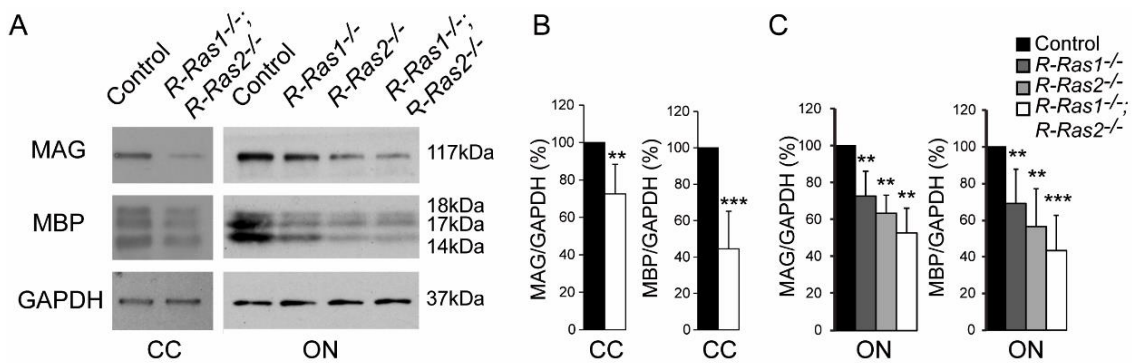
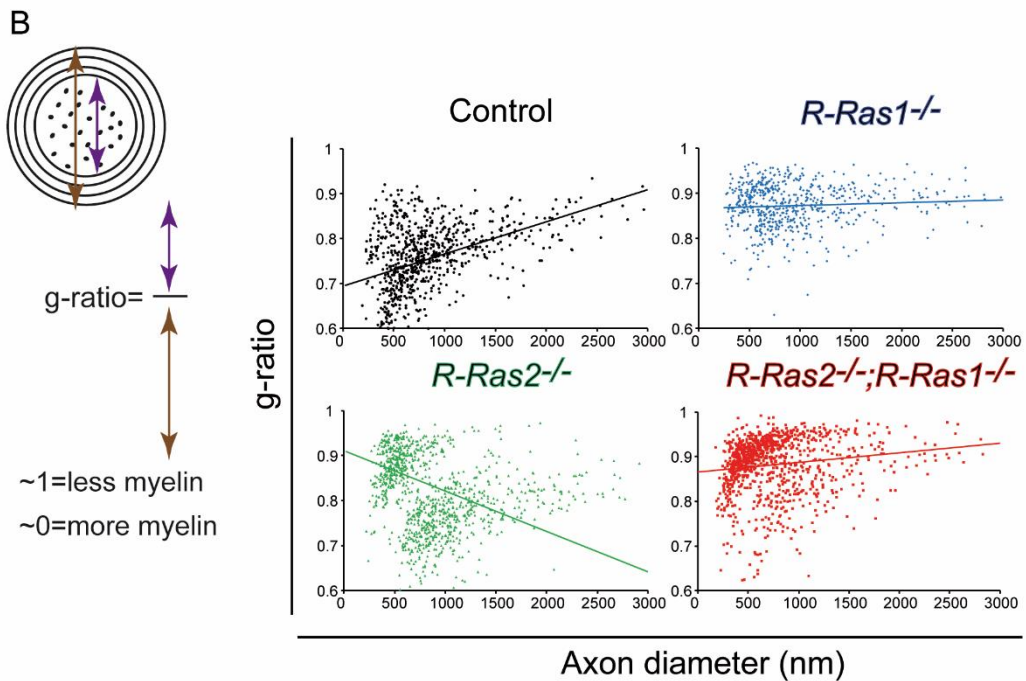
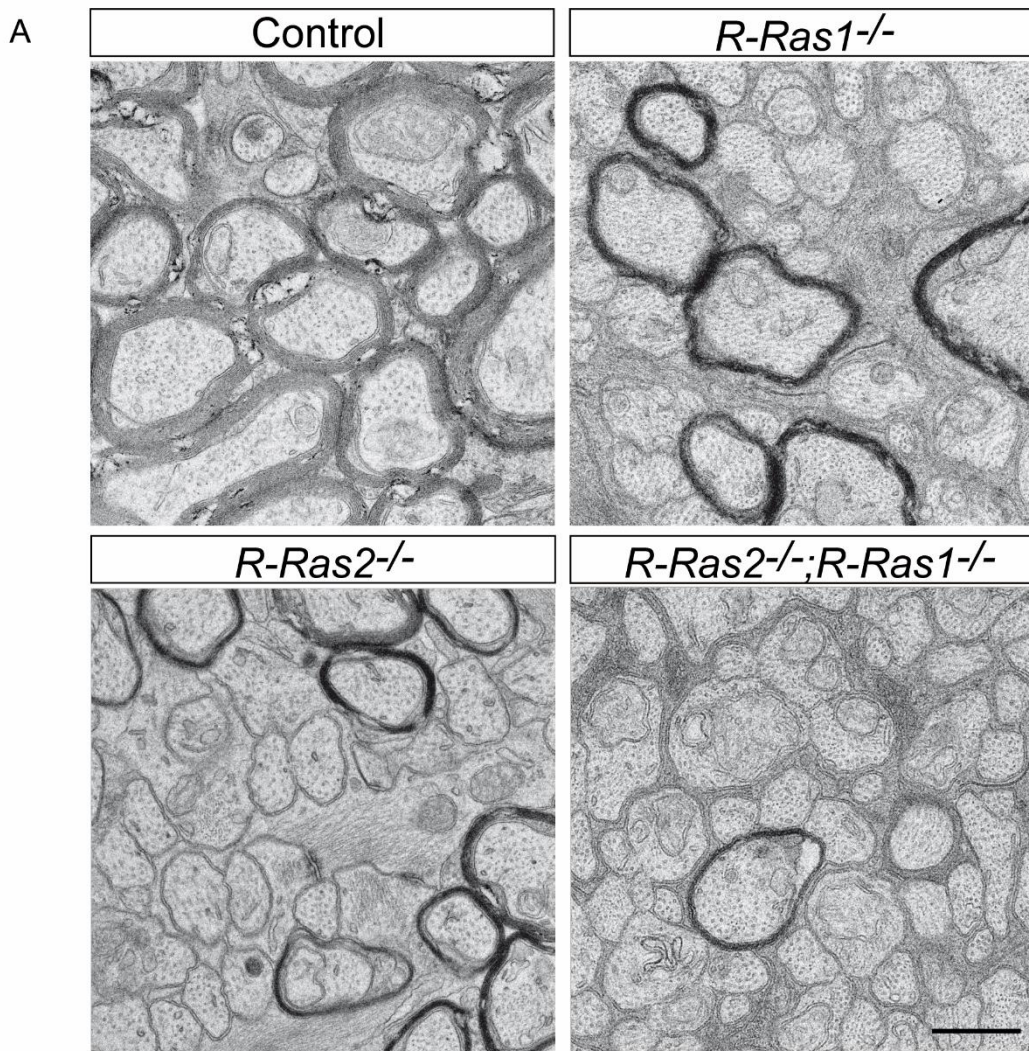


Figura 24. La ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 conlleva una disminución de proteínas presentes en la mielina como MAG y MBP. **A**, Western blot realizados con lisados de cuerpo calloso y nervio óptico de ratones *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} en comparación con los controles. En ambos tejidos se hace notable la reducción de MAG y MBP en los mutantes comparados con los controles. **B**, Disminución significativa de la expresión de MAG y MBP en el cuerpo calloso. El gráfico de barras representa la media ± desviación estándar del cambio relativo al control de las mediciones normalizadas a GAPDH a partir de tres experimentos diferentes: MAG *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 72,48 ± 15,91% (p = 0,004); MBP *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 44,52 ± 20,53% (p <0,0001). **C**, Disminución significativa de la expresión de MAG y MBP en el nervio óptico. El gráfico de barras representa la media ± DE del cambio relativo al control de las mediciones normalizadas a GAPDH a partir de tres experimentos diferentes: MAG *R-Ras1*^{-/-} 72,89 ± 13,29% (p = 0,0083), *R-Ras2*^{-/-} 63,65 ± 9,45% (p = 0,0026), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 52,82 ± 13,19% (p = 0,0035); MBP *R-Ras1*^{-/-} 69,24 ± 18,41% (p = 0,0057), *R-Ras2*^{-/-} 56,36 ± 20,54% (p = 0,0014), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 43,47 ± 19,03% (p = 0,00016). n=3.

5.2. El grosor de las vainas de mielina está reducido en los ratones *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*

Con el fin de examinar la ultraestructura de las vainas de mielina que rodean los axones, analizamos los nervios ópticos de ratones adultos (P90) *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* y controles cortados transversalmente, mediante técnicas de microscopía electrónica (ME). Encontramos que la vaina de mielina era más delgada en los mutantes simples y dobles en comparación con los controles (Fig. 25A). Utilizamos el parámetro de g-ratio para cuantificar la cantidad de mielina que rodea a los axones individuales. El g-ratio, es la relación existente entre el diámetro del axón y la cantidad de mielina que lo recubre. De esta manera, valores próximos a la unidad, indican que el axón está muy poco mielinizado, mientras que valores próximos a cero indican axones bien mielinizados (Fig. 25B, esquema). Así pues, la cuantificación morfológica de los g-ratio para las fibras individuales en relación al diámetro de sus axones respectivos (Fig. 25B), confirmó la reducción en el espesor de la vaina de mielina en los ratones *R-Ras1^{-/-}* y *R-Ras2^{-/-}*, siendo mucho más pronunciada en los ratones dobles mutantes en comparación con los ratones control (Fig. 25B). Específicamente, identificamos aumentos muy significativos en el valor medio de los g-ratio en los ratones *R-Ras1^{-/-}* = $0,87 \pm 0,04$, $p < 0,0001$, *R-Ras2^{-/-}* = $0,8 \pm 0,08$, $p < 0,0001$ y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* = $0,89 \pm 0,06$, $p < 0,000$, en comparación con los controles ($0,75 \pm 0,09$).



Resultados

Figura 25. El grosor de las vainas de mielina en los ratones $R-Ras1^{-/-}$, $R-Ras2^{-/-}$ y $R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}$ es mucho menor que en los controles, exhibiendo g-ratios medios significativamente más altos. **A**, Secciones transversales del nervio óptico de ratones adultos (P90) control, $R-Ras1^{-/-}$, $R-Ras2^{-/-}$ y $R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}$ analizados mediante ME muestran una disminución significativa del grosor de las vainas de mielina en los mutantes simples siendo ésta mucho más drástica en los mutantes dobles en comparación con los controles. **B**, Izquierda: esquema de medida y cálculo del g-ratio. Derecha: Los diagramas de dispersión muestran la cuantificación morfométrica de los g-ratio (eje y) de las fibras individuales en relación con los diámetros axonales respectivos (eje x). Existe un aumento significativo en los g-ratio medios en $R-Ras1^{-/-}$ ($0,87 \pm 0,04$; $p = 0,000012$. $n = 924$ axones analizados), $R-Ras2^{-/-}$ ($0,8 \pm 0,08$; $p = 0,000011$. $n = 1014$ axones analizados) y $R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}$ ($0,89 \pm 0,06$; $p = 0,000072$. $n = 1037$ axones analizados) en comparación con los controles ($0,75 \pm 0,09$. $n = 764$ axones analizados).

Posteriormente, medimos el espesor de las vainas de mielina que cubrían los axones, y encontramos que, independientemente del calibre de los mismos existía un claro adelgazamiento de las vainas tanto en los mutantes simples ($R-Ras1^{-/-}=105\pm 53$ nm, $p<0,0001$; $R-Ras2^{-/-}=159\pm 75$ nm, $p<0,0001$), como en los dobles ($R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}=73\pm 40$ nm, $p=0,0001$) comparados con los controles (251 ± 60 nm) (Fig. 26). Estos resultados, ponen de manifiesto una hipomielinización acusada en los mutantes simples carentes de R-Ras1 o R-Ras2, siendo mucho más severa la hipomielinización hallada en el doble mutante.

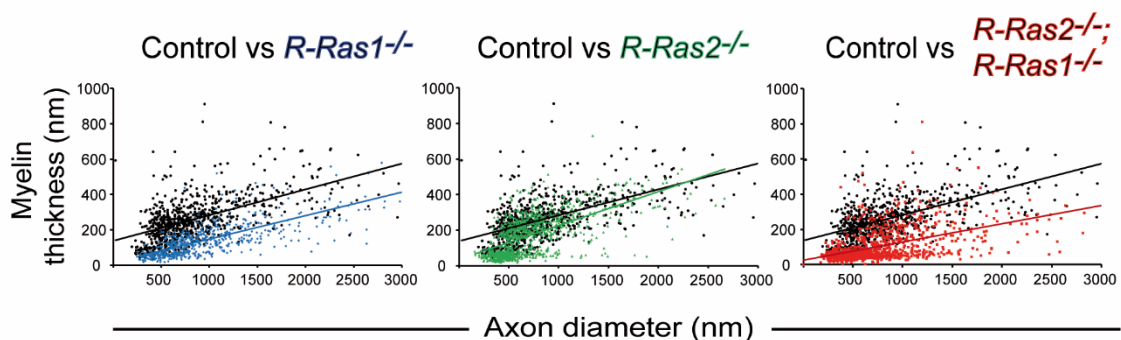


Figura 26. Grosor de la vaina de mielina en $R-Ras1^{-/-}$, $R-Ras2^{-/-}$ y $R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}$ comparado con el control. Los gráficos de dispersión representan la variación del grosor de la mielina (eje y) con respecto al diámetro de los axones (eje x) en mutantes simples y dobles en comparación con el control. Los valores medios del grosor de la mielina en los diferentes genotipos serían los siguientes: control = 251 ± 60 nm, $n = 764$ axones analizados; $R-Ras1^{-/-}= 105 \pm 53$ nm, $p < 0,0001$, $n = 924$ axones analizados; $R-Ras2^{-/-} =$

159 ± 75 nm, p <0,0001, n = 1014 axones analizados; *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* = 73 ± 40 nm , p <0,0001, n = 1037 axones analizados. Barra de escala: 500nm.

5.3. Los mutantes *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* mostraron una disminución en el número de axones mielinizados

Cuantificamos, además, el número de axones mielinizados, encontrando que, aunque en ausencia de R-Ras1 ya habíamos observado una disminución en la cantidad de mielina (Fig. 24A, C, 25A, B y 26), no se observaron cambios en el número de axones mielinizados comparándolo con los controles (Fig. 27). Por otro lado, la ausencia de R-Ras2 sí produjo una reducción del 30% en el número de axones mielinizados coincidente con la pérdida de mielina observada (Fig. 27). El doble mutante presentó el fenotipo más dramático con una disminución del 75% en el número de axones mielinizados (Fig. 27). Aun no existiendo cambios en el número de axones mielinizados en el ratón *R-Ras1^{-/-}* la disminución de mielina (Fig. 24,25) se observó en todos los genotipos. Esto se debe a que la vaina de mielina que recubre los axones de estos mutantes es más delegada que la de los ratones control (Fig. 25 A, B y 26). En conjunto, todos estos datos demuestran una severa hipomielinización del nervio óptico en ratones que carecen de R-Ras1 o de R-Ras2 siendo más drástica en ausencia de ambas proteínas. Por lo tanto, el fenotipo del doble mutante es el resultado de la pérdida de envueltas observada en R-Ras1 y R-Ras2.

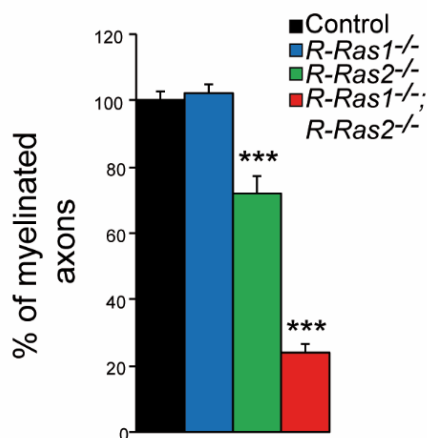


Figura 27. El número de axones mielinizados disminuye significativamente en ausencia de R-Ras2 o de R-Ras1 y R-Ras2. El gráfico muestra el porcentaje de axones mielinizados presentes en el nervio óptico de *R-Ras1^{-/-}* = 102 ± 2,7%, *R-Ras2^{-/-}* = 72,1 ± 5,2% y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* = 23,9 ± 2,5% en comparación con el control = 100 ± 2,8%. Se observaron diferencias significativas en *R-Ras2^{-/-}* (p <0,0001) y en *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* (p <0,0001).

5.4. La estructura, el grado y la periodicidad de la compactación de la mielina no se ve afectada en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2

Posteriormente, a mayores aumentos, analizamos la estructura, el grado y la periodicidad de la compactación de las vainas de mielina, no encontrando diferencias entre los ratones mutantes y los ratones control (Fig. 28). Sin embargo, encontramos una disminución en el número de envueltas en las vainas de mielina de los ratones mutantes simples, siendo más drástica en los dobles mutantes (Fig. 28). Por lo tanto, concluimos que, la disminución tan acusada en el espesor de las vainas surge de un menor número de capas de mielina. El fenotipo del doble mutante indica que R-Ras1 y R-Ras2 desempeñan papeles aditivos, pero no redundantes en la mielinización.

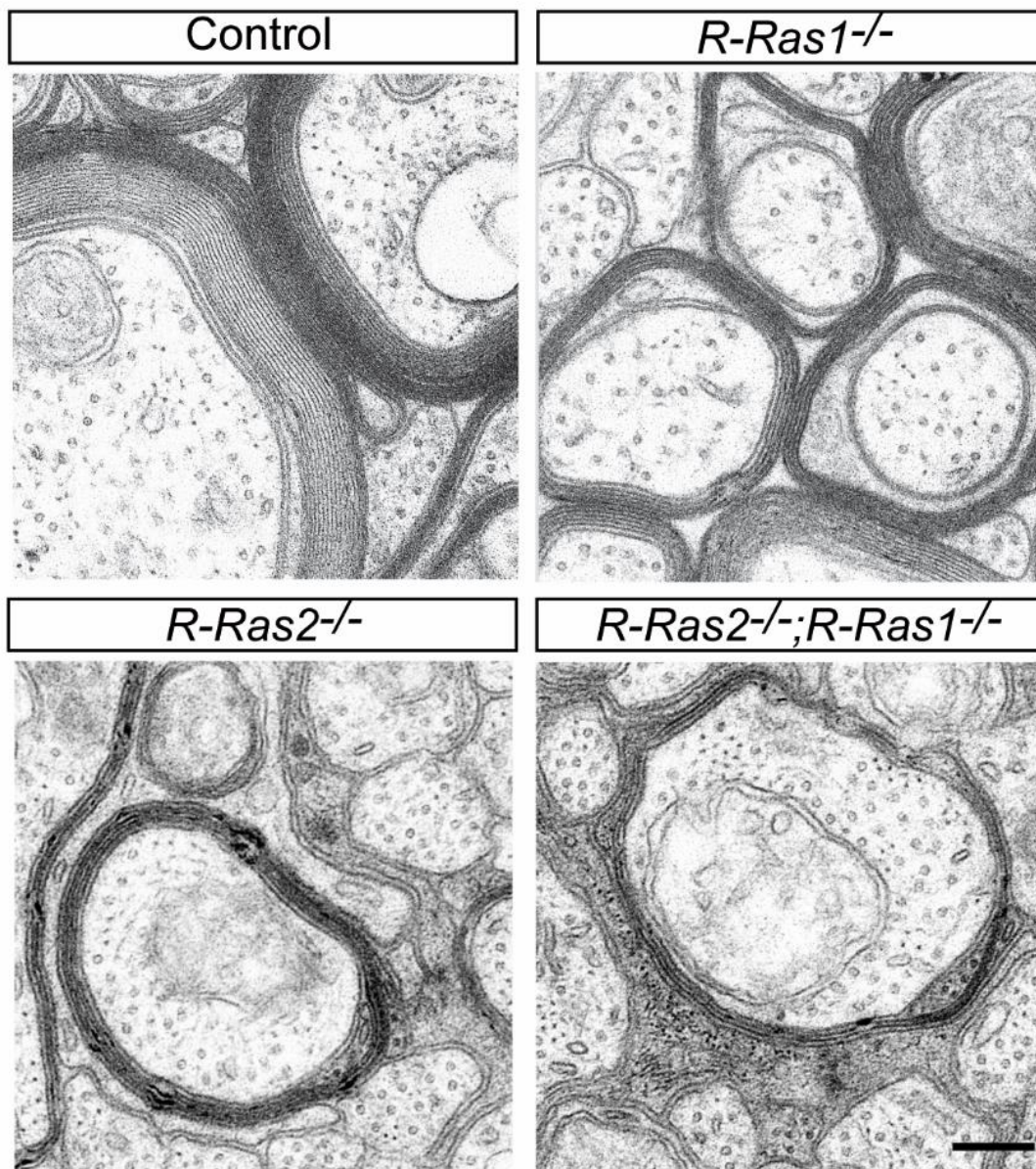


Figura 28. La ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 no afecta a la estructura, periodicidad ni la compactación de la mielina. Imágenes a mayores aumentos de ME no muestran diferencias en la estructura, compactación y periodicidad de la mielina en ratones mutantes en comparación con los controles. Sin embargo, *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y más dramáticamente *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*, muestran menos envueltas de mielina rodeando los axones mielinizados en comparación con los controles. Barra de escala 250nm.

6. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 aumenta en número de axones con diámetros más pequeños en detrimento de los axones de mayor diámetro

Para saber si la ausencia de mielina afectaba el calibre del axón realizamos estudios de ME. Estos estudios mostraron una disminución en el diámetro de los axones en los dobles mutantes en comparación con los controles. Tras la clasificación de los axones en función de su diámetro (Fig. 29), los dobles mutantes mostraron un aumento en el número de axones de menor calibre asociado con una disminución en los axones de mayor diámetro (*R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* = 42% de aumento en los axones <400 nm, $p < 0,0001$ y una reducción del 29% en axones > 1000 nm, $p = 0,0002$).

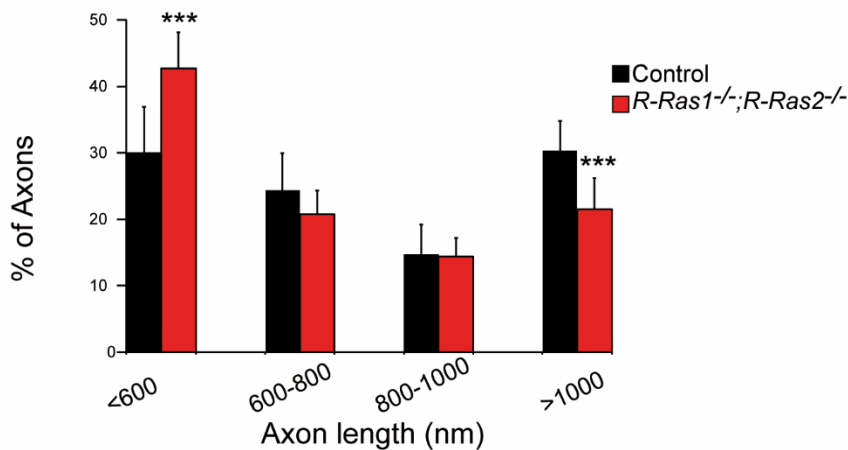


Figura 29. Cambio en el diámetro axonal en ausencia de R-Ras1 y R-Ras2. El gráfico muestra el porcentaje de axones clasificados según sus diámetros en ratones de control y dobles mutantes. En comparación con el control, los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* mostraron un aumento significativo en los axones más pequeños, diámetros menores de 600 nm, (control = 30%, *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* = 42,6% de los axones, $p < 0,0001$) y una disminución significativa en los axones que miden más de 1000 nm (control = 30,3%, *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* = 21,5% de los axones, $p = 0,0002$). Todas las muestras se obtuvieron de ratones adultos (P90).

7. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta diferenciación de los OLs.

7.1. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 se produce un aumento en el número de OLs que expresan marcadores de inmadurez.

La pérdida de mielina observada en los ratones carentes de R-Ras1 y/o R-Ras2 (Fig. 25, 26) fue mucho más acusada que la disminución en el número de OLs (Fig. 19). Por ello, quisimos evaluar si esta pérdida de mielina era consecuencia de alteraciones en la diferenciación de los OPCs. Realizamos tinciones inmunohistoquímicas con anti-O4 (un antígeno de sulfatida y pro-oligodendroblastos), marcador específico de pre-OLs y OLs pre-mielinizantes inmaduros (Sommer and Schachner, 1981; Dawson et al., 2000; Woodruff et al., 2001; Ramos et al., 2011) en secciones coronales de ratones a P15. El cuerpo calloso de los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*, mostró una mayor intensidad en la señal de O4, lo que sugiere una que los OLs presentes en los dobles mutantes son inmaduros en comparación con los controles (Fig. 30A, B).

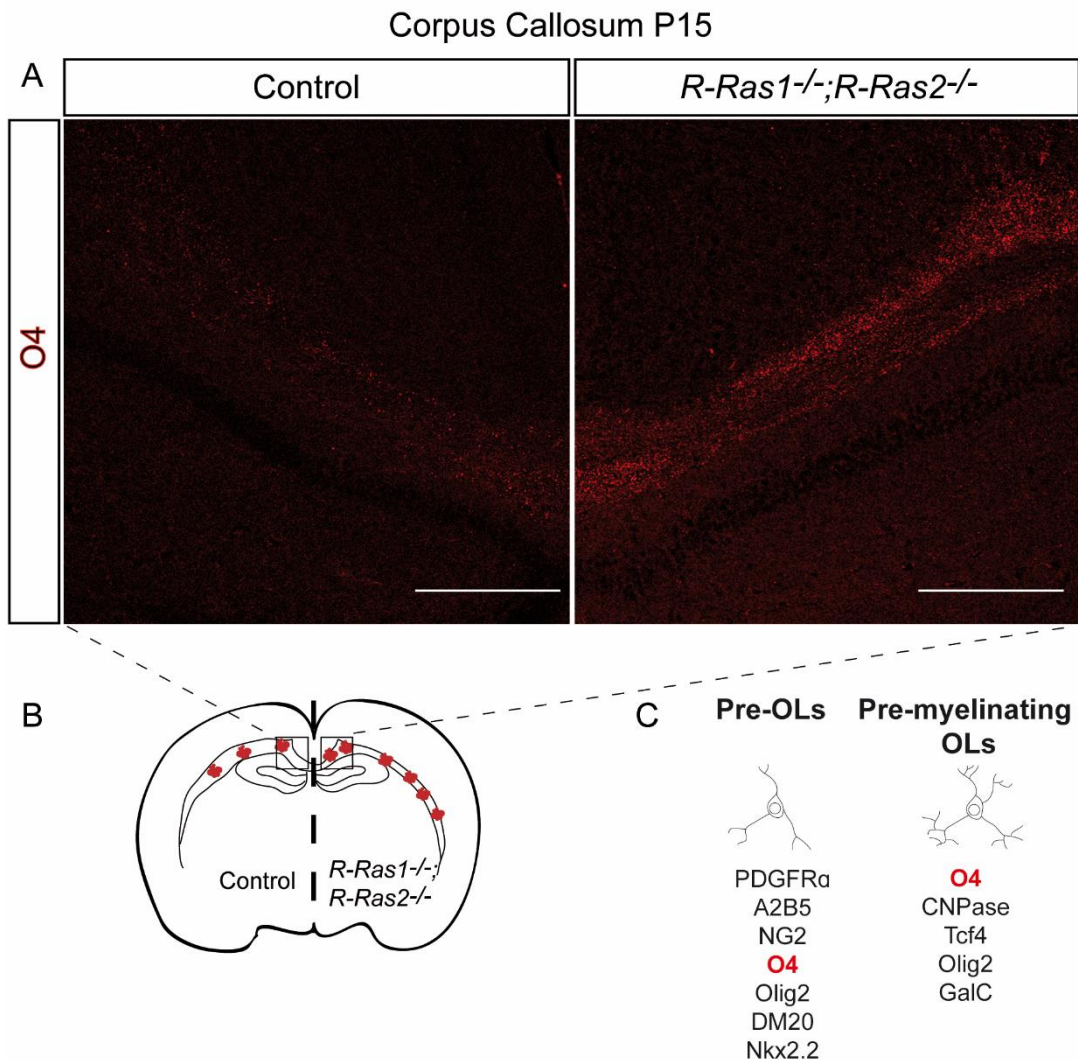


Figura 30. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 aumenta la señal de O4. **A**, Imágenes especulares de secciones cerebrales coronales de ratones control y ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* a P15, inmunomarcados con un anticuerpo anti-O4 (rojo). Las imágenes corresponden al cuerpo calloso (interaoral 2,36-2,48 mm y bregma -1,43 mm (Paxinos y Franklin, 2013)). Se observa una tinción más intensa en los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*, lo que indica un aumento en la proporción de OLs pre-mielinizantes en los dobles mutantes en relación con los controles. **B**, Representación esquemática de las diferentes inmunotinciones de O4 observadas en los mutantes dobles en comparación con los controles. El hemisferio derecho representa la situación observada en los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* en los que el cuerpo calloso muestra más OLs pre-mielinizantes (rojo) que los controles (hemisferio izquierdo). **C**, Esquema de los diferentes estadios de maduración de OPCs y OLs en los que se expresa O4 (pre-OLs y OLs pre-mielinizantes). Barra de escala:250µm.

Además, realizamos dobles tinciones inmunohistoquímicas con anti-Tcf4, un marcador específico de OLs inmaduros pre-mielinizantes (Emery, 2010) y anti-Olig2, que reconoce el linaje oligodendrocítico completo. A P15, encontramos un aumento significativo en la población de OLs inmaduros (Tcf4⁺) en los ratones dobles mutantes en comparación con los controles (Fig. 31A, B). La proporción de OLs inmaduros (Tcf4⁺) en relación con la población oligodendrocítica total (Olig2⁺) fue aproximadamente del doble en los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* en relación con los ratones control ($100 \pm 7\%$ para los controles y $191 \pm 39\%$ para *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*, $p = 0,016$; Fig. 31B). Además, realizamos las mismas tinciones a distintos tiempos y observamos que el aumento en Tcf4 se mantenía a P30 ($100 \pm 20\%$ para los controles y $255 \pm 14\%$ para *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*, $p = 0,002$; Fig. 31B) y a P120 ($100 \pm 27\%$ para los controles y $170 \pm 53\%$ para *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*, $p = 0,017$; Fig. 31B). Así pues, encontramos un aumento significativo en la población de OLs inmaduros, no solo en las etapas postnatales tempranas (P15 y P30), sino también en los ratones adultos (P120).

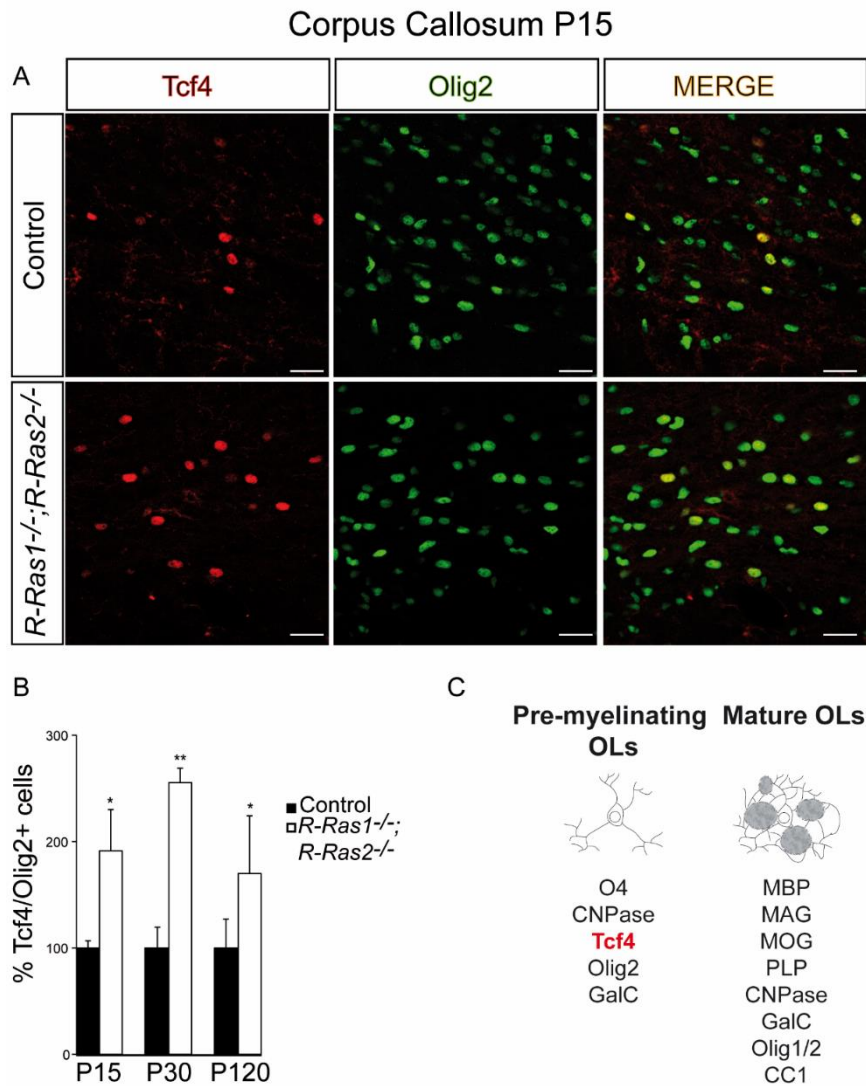


Figura 31. En ausencia de *R-Ras1* y *R-Ras2* aumenta el número de OLs premielinizantes. **A**, Doble tinción inmunohistoquímica con anti-Tcf4 (rojo) y anti-Olig2 (verde) en el cuerpo calloso de ratones P15 control (arriba) y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* (abajo). Los ratones dobles mutantes presentan más OLs premielinizantes que los controles (células Tcf4/Olig2positivas) a P15. **B**, El gráfico de barras muestra el porcentaje de OLs pre-mielinizantes (células Tcf4⁺) en relación con la cantidad de células oligodendrogiales (células Olig2⁺) en los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* relativizado al control (100%). Los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* muestran un aumento significativo en el número de OLs inmaduros en comparación con los controles. (P15: *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* = 91% de aumento p = 0,016; P30: *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* = 155% de aumento, p = 0,002 y P120: *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* = 70% de aumento, p = 0,017). **C**, Esquema de las fases de maduración de los OLs en las que se expresa Tcf4 (OL pre-mielinizante) y cuando deja de expresarse (OL maduro). n = 3. Barra de escala: 25µm.

7.2. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 se produce una disminución en el número de OLs maduros

Para comprobar si, en ausencia de estas GTPasas se producía una disminución en el número de OLs maduros, realizamos dobles tinciones inmunohistoquímicas en ratones adultos (P120) con anti-Olig2 y anti-CC1, un marcador de OLs maduros (Fig. 32A). Las tinciones mostraron, una reducción significativa en la proporción de OLs maduros en el doble mutante ($35,8 \pm 8,6\%$ de células CC1/Olig2⁺) en comparación con el control ($83,8 \pm 0,9\%$ de células CC1/Olig2⁺, $p = 0,0006$, Fig. 32 A, B). Por lo tanto, R-Ras1 y R-Ras2 parecen ser necesarios para la correcta maduración de los OLs.

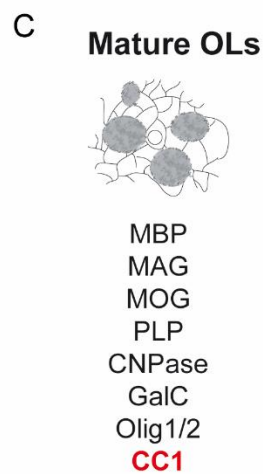
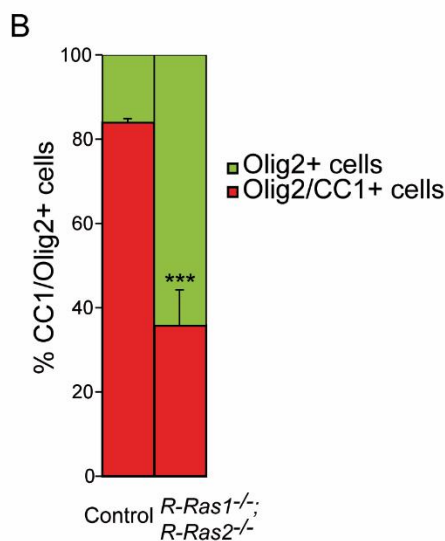
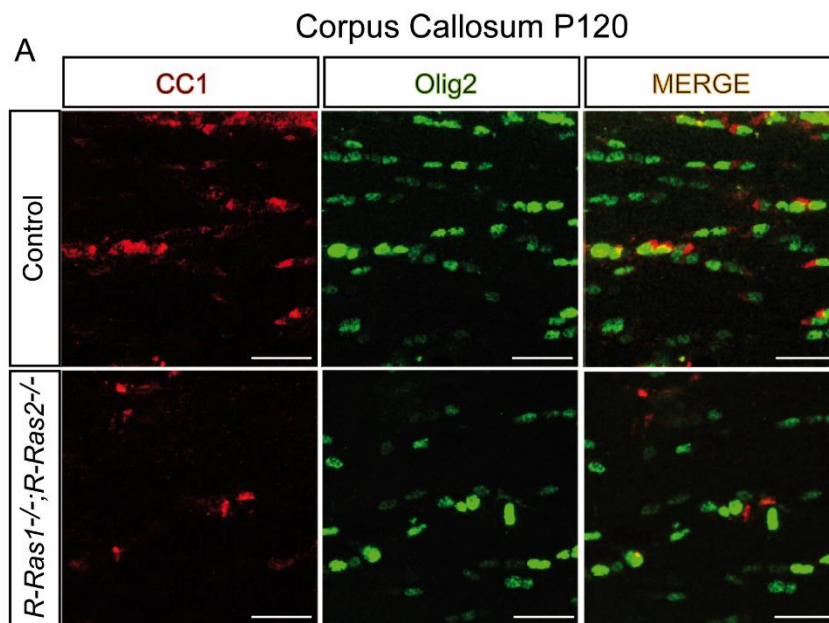


Figura 32. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 se produce un descenso en el número de OLs maduros. **A**, Doble tinción inmunohistoquímica con anti-CC1 (rojo) y anti-Olig2 (verde) en el cuerpo calloso de ratones control P120 (arriba) y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* (abajo). Los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* mostraron una reducción drástica en la proporción de OLs maduros (células CC1/Olig2⁺), en comparación con los controles. **B**, Cuantificación del porcentaje de OLs maduros (células CC1⁺) con respecto a la cantidad total de OLs (células Olig2⁺). Se encontró una disminución significativa en el porcentaje de células CC1 positivas en los dobles mutantes en comparación con los controles (*R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* = 57,3% de disminución $p = 0,0006$). **C**, Esquema que muestra el estadio de maduración del OL en el que se expresa CC1 (OL maduro). $n = 3$. Barra de escala: 25 μm .

7.3. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta diferenciación morfológica de los OPCs en OLs maduros *in vitro*

Para estudiar cómo la falta de R-Ras1 y R-Ras2 alteraba la maduración de los OLs, realizamos cultivos primarios enriquecidos de OLs de la corteza y del nervio óptico de ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* y controles P0. Tras 14 días *in vitro* (DIV) para su diferenciación, los OLs de los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* mostraban una morfología más simple que los de los ratones control, exhibiendo una morfología compatible con la de OLs inmaduros (Fig. 33A). Las tinciones inmunohistoquímicas realizadas con anticuerpos anti-CNPasa y anti-Olig2 nos permitieron clasificar los OLs en dos grupos en función de su morfología. Por un lado, cuantificamos OLs con procesos muy simples (sólo contaban con procesos primarios y secundarios) y por otro, OLs con procesos más complejos (aquellos que formaban una red con procesos terciarios o de mielina). Los ratones dobles mutantes mostraban más OLs con procesos simples que los ratones control en detrimento de los OLs con procesos más complejos ($45,7 \pm 12,69\%$ de aumento de OLs con procesos simples para *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* en relación con el control, $p = 0,0106$; Fig. 33B). Esta cuantificación de la morfología celular (introducida por Kremer et al., 2009) sugiere diferencias en la maduración de los OL *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* y los ratones control. Por lo tanto, concluimos que los OLs de los ratones dobles mutantes adquieren morfologías más simples con redes de procesos menos complejas. Esto indica que R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la adecuada diferenciación morfológica de los OLs *in vitro*.

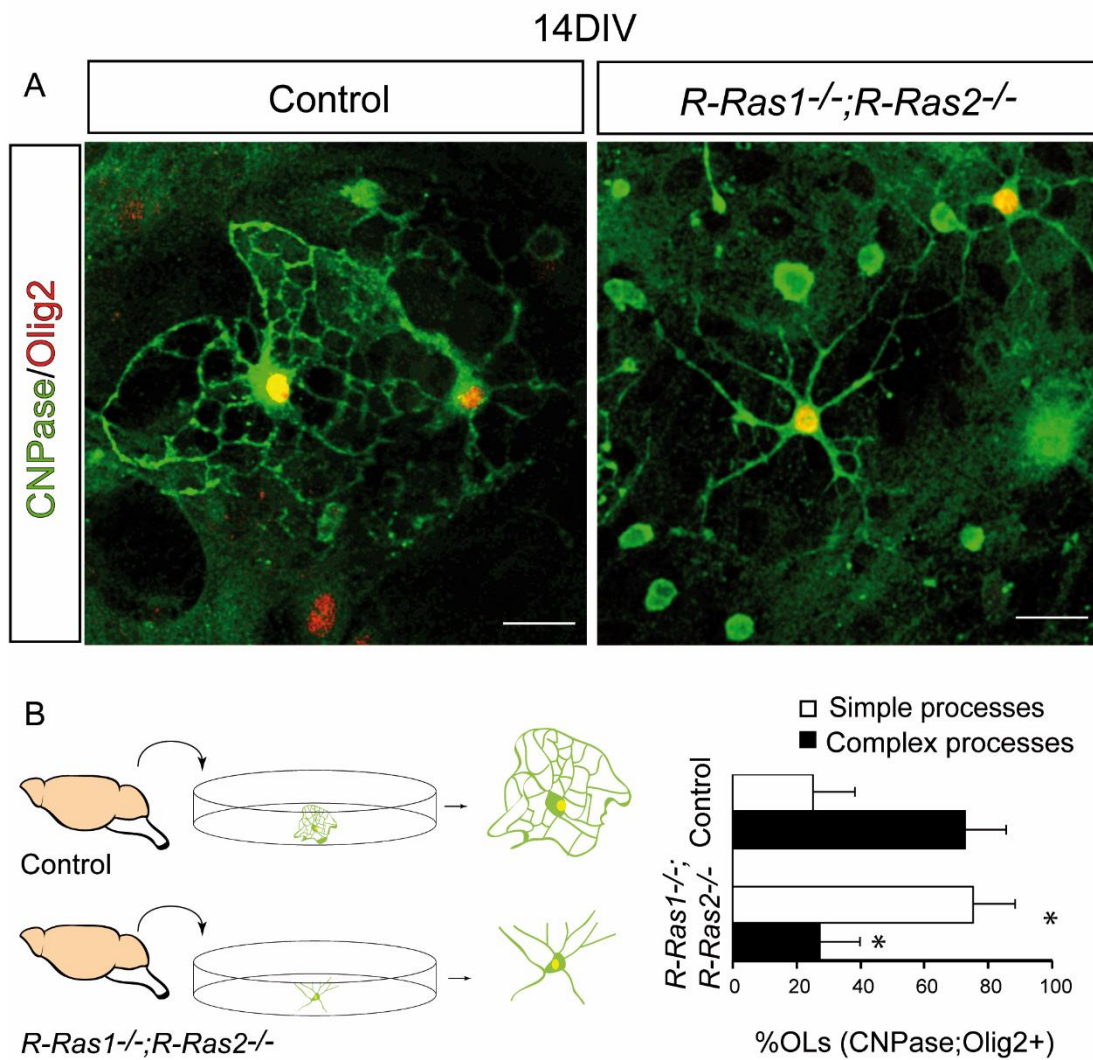


Figura 33. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta diferenciación morfológica de los OLs *in vitro*. **A**, Imágenes representativas de las morfologías de OLs encontradas en cultivos primarios teñidos de CNPasa (verde) y Olig2 (rojo). Después de 14 DIV, los OL del doble mutante muestran una morfología mucho más simple que los controles. **B**, Representación esquemática de los cultivos primarios enriquecidos de OLs de corteza de ratones control y *R-Ras1*^{-/-};*R-Ras2*^{-/-} que muestra una morfología más simple en los dobles mutantes. La gráfica de barras muestra la proporción de OLs (células CNPase/Olig2⁺) con procesos simples y complejos para cada genotipo. La mayoría de los OLs del doble mutante poseen procesos simples (72,85 ± 12,7%, n = 101 OLs cuantificados) que difieren significativamente de los controles (27,15 ± 12,7%, p = 0,0106, n = 121 OLs cuantificados). Algunos OLs del doble mutante tenían procesos complejos (24,9 ± 13,3%) que difirieron significativamente de los controles (75,1 ± 13,3%, p = 0,0106).

8. R-Ras1 y R-Ras2 modifican el tamaño y el número de los nódulos de Ranvier y por tanto, la velocidad de conducción.

8.1. La falta de R-Ras1 y R-Ras2 conlleva un aumento del número de nodos de Ranvier y, por tanto, vainas de mielina más cortas

Los OLs maduros forman vainas de mielina alrededor de los axones en segmentos (internodos) separados por los nódulos de Ranvier, que son interrupciones cortas y periódicas en la vaina de mielina (Fig. 34B). Dada la hipomielinización observada en el nervio óptico y el cuerpo calloso de los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*, quisimos analizar la estructura de la región nodal mediante tinciones inmunohistoquímicas contra una proteína localizada en la región paranodal (paranodo), Caspr (Kamasawa et al., 2005; Murcia-Belmonte et al., 2016). Estas tinciones fueron realizadas en cortes longitudinales de nervio óptico de ratones adultos (P90). El análisis de las imágenes de microscopía confocal reveló un aumento de paranodos en los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* comparados con los controles ($80,85 \pm 19,71$ paranodos / $67 \times 67 \mu\text{m}$ para el doble mutante y $54,09 \pm 14,22$ paranodos / $67 \times 67 \mu\text{m}$ para el control, $p = 0,000124$; Fig. 34A, C).

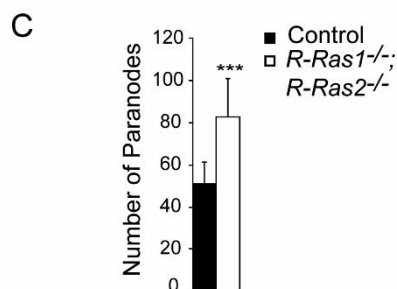
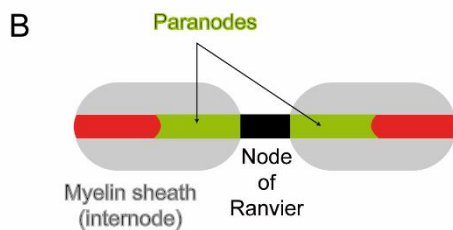
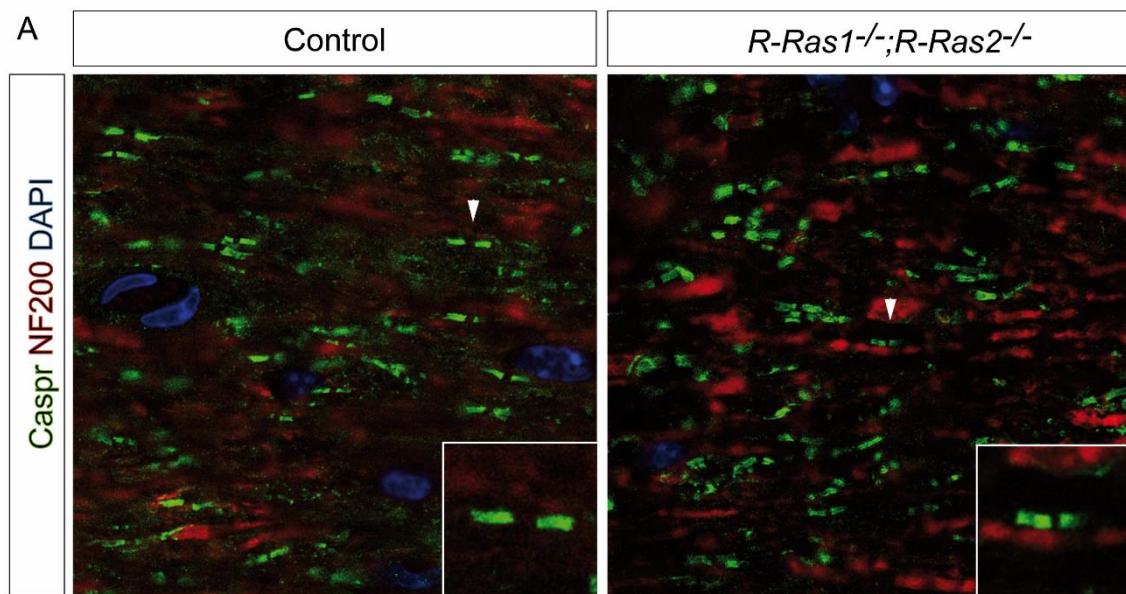


Figura 34. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 se produce un aumento del número de nodos. **A**, Tinción inmunohistoquímica realizada en cortes longitudinales de nervio óptico de ratones adultos (P90) controles y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-}, contra Caspr (verde), proteína que se encuentra en los paranodos. En rojo, teñidos con neurofilamento 200 estarían los axones. **B**, Esquema que representa dos internodos o vainas de mielina. Entre ellas, estaría, en negro, el nódulo de Ranvier y a los lados de éste, en verde estarían los paranodos. En rojo estaría representado el axón. **C**, Cuantificación del número de paranodos. La gráfica muestra el aumento significativo del número de paranodos encontrados en los dobles mutantes ($80,85 \pm 19,71$ paranodos/ $67 \times 67 \mu\text{m}$) comparados con los controles ($54,09 \pm 14,22$ paranodos/ $67 \times 67 \mu\text{m}$) ($p = 0,000124$; $n = 4$).

De hecho, western blots realizados con homogeneizados de nervios ópticos de ratones adultos *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} y controles confirmaron el incremento de la proteína Caspr en los dobles mutantes en comparación con los controles ($p = 0,016$; Fig. 35).

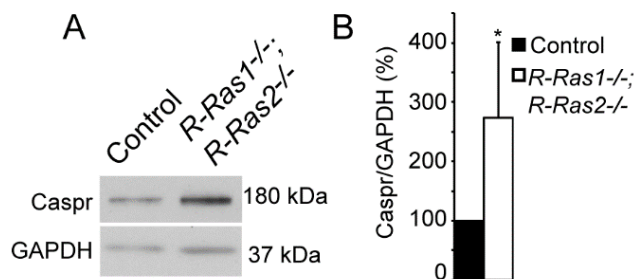


Figura 35. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 hay un aumento de proteína Caspr. **A**, Western blot de lisados de nervio óptico de ratones adultos P90 que muestra un aumento significativo en la

expresión de la proteína Caspr en los dobles mutantes en comparación con los controles. **B**, El gráfico de barras muestra la media \pm DE de las mediciones densitométricas normalizadas a GAPDH y relativas a los controles ($p = 0,016$; $n = 5$).

Está descrito, que el número de paranodos, es una medida indirecta de la longitud de las vainas de mielina (Savvaki et al., 2008). Así pues, el aumento del número de paranodos en el doble mutante indica una longitud internodal más corta, es decir, vainas de mielina (internodos) más cortas en comparación con los controles (Figura 37).

8.2. La falta de R-Ras1 y R-Ras2 conlleva un aumento en la proporción de nodos más cortos en detrimento de los más largos sin afectar la longitud de los paranodos

Una mielinización alterada correlaciona con estructuras nodales y paranodales aberrantes (Savvaki et al., 2008; Tanaka et al., 2009; Lee et al., 2011; Murcia-Belmonte et al., 2016). Así pues, clasificamos los nodos y los paranodos en función de su longitud, no encontrando diferencias significativas en la longitud de los paranodos (Fig. 36A, 34A). Por el contrario, sí encontramos un aumento dramático en la proporción de nodos más cortos (menos de 0,5 micras) en los ratones *R-Ras1*^{-/-};*R-Ras2*^{-/-} en relación con los controles ($30 \pm 4,5\%$ para los dobles mutantes y $7,4 \pm 5,1\%$ para los controles, $p = 0,004$; Fig. 36B y 34A inserto en caja). En consecuencia, estos ratones dobles mutantes muestran una disminución en el porcentaje de nodos de mayor longitud (entre 1 y 1,5 micras: $6,95 \pm 4,05\%$ para *R-Ras1*^{-/-};*R-Ras2*^{-/-} y $25,65 \pm 6,05\%$ para ratones control, $p = 0,011$; Fig. 36B y 34A inserto en caja).

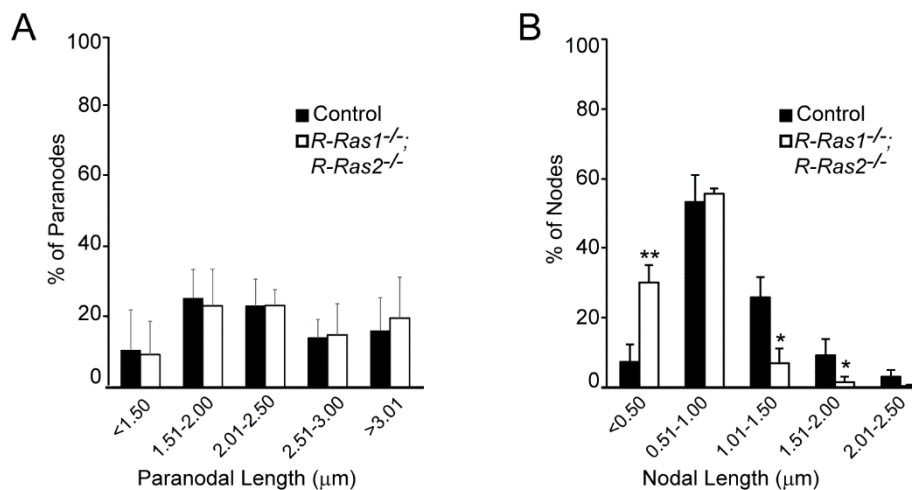


Figura 36. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 hay un acortamiento de la longitud de los nodos de Ranvier. **A**, La clasificación de los paranodos en función de su longitud no revela ninguna diferencia entre los ratones *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} y los controles. **B**, La clasificación de los nodos en función de su longitud revela más nodos cortos en los ratones *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} ($30,5 \pm 4,5\%$ de nodos $<0,5 \mu\text{m}$ de largo) que en controles ($7,5 \pm 5,1\%$ de nodos $<0,5 \mu\text{m}$ de largo, $p = 0,004$) a expensas de los nodos más largos (entre 1 y 1,5 micras: $6,95 \pm 4,05\%$ para *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} y $25,65 \pm 6,05\%$ para los ratones control, $p = 0,011$). $n=4$.

Por lo tanto, el aumento del número de nódulos de Ranvier en el doble mutante comparado con el control, conlleva un aumento en el número de internodos que, además, disminuyen su longitud (vainas de mielina aproximadamente un 15% más cortas que las de los ratones control) (Fig. 37).

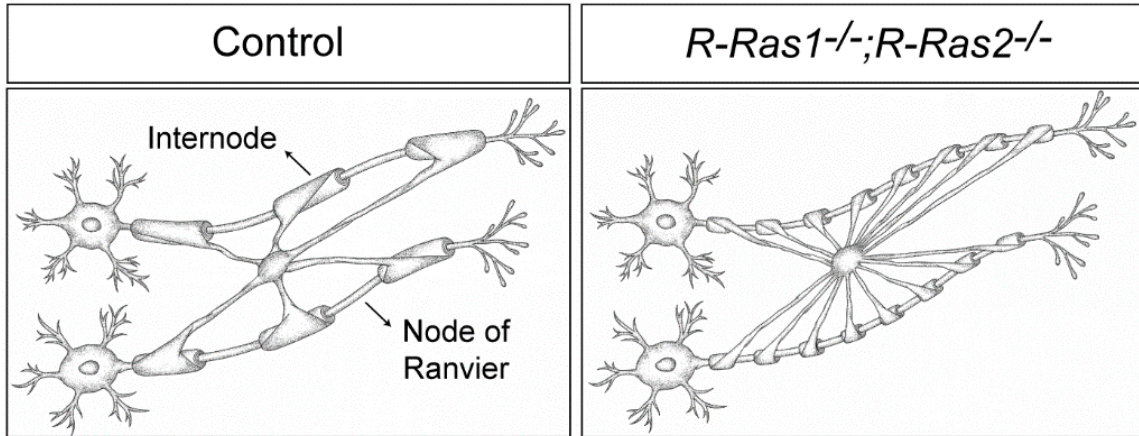


Figura 37. Representación esquemática del mayor número de nódulos de Ranvier más cortos y del mayor número de internodos más cortos observados en los ratones *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}* en comparación con los controles.

9. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta transmisión del impulso nervioso

La disminución del grosor de la vaina de mielina y la presencia de nódulos de Ranvier más cortos podrían provocar una conducción anómala de los impulsos nerviosos en los principales tractos mielinizados del SNC (Richardson et al., 2000; Bakiri et al., 2011). Por ello, medimos la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos a lo largo del nervio óptico *in vivo*. Se implantaron electrodos de registro en la parte dorsal del núcleo geniculado lateral de ratones adultos (P120) controles, *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}* (Fig. 38A-C) y se estimuló a los animales bilateralmente con destellos de luz. Como se describió previamente (Wiggins et al., 1982; Meeren et al., 1998), la estimulación súbita evoca un potencial de campo temprano positivo-negativo-positivo seguido de algunos componentes oscilatorios tardíos. El componente positivo temprano (P1, Fig. 38 C) presentó latencias similares para los cuatro grupos de ratones ($9,58 \pm 1,09$ ms para los controles, $9,73 \pm 1,67$ ms para *R-Ras1^{-/-}*, $p = 0,542$; $10,32 \pm 2,38$ ms para *R-Ras2^{-/-}*, $p = 0,945$ y $9,77 \pm 1,35$ ms para *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}*, $p = 0,715$; Fig. 38 D), que confirmó la presencia de axones no afectados en el nervio óptico (ver en apartado 5). Estas latencias estaban en el rango de activación unitaria de células ganglionares por estimulación fótica en ratones (Lintas et al., 2013). El componente negativo del potencial de campo evocado presentó caídas descendentes

Resultados

sucesivas y una duración total más larga en los ratones mutantes en comparación con los controles (Fig. 38 C). Estas sucesivas ondas negativas sugieren una despolarización retardada de las neuronas del geniculado desde los terminales axónicos de las células ganglionares que llegan. De hecho, el análisis cuantitativo de la latencia de los potenciales evocados visuales mostró un aumento significativo en su latencia en ratones mutantes simples y dobles en relación con los ratones control ($19,19 \pm 2,90$ ms para los controles, $23,08 \pm 1,51$ ms para $R-Ras1^{-/-}$, $p = 0,00081$; $24,51 \pm 2,71$ ms para $R-Ras2^{-/-}$, $p = 0,000385$; y $26,36 \pm 2,22$ ms para $R-Ras1^{-/-}, R-Ras2^{-/-}$, $p = 0.0000022$; Fig. 38 E). Aunque se encontramos alteraciones en la velocidad de conducción de los mutantes simples, $R-Ras1^{-/-}$ y $R-Ras2^{-/-}$, encontramos las diferencias más dramáticas en el doble mutante.

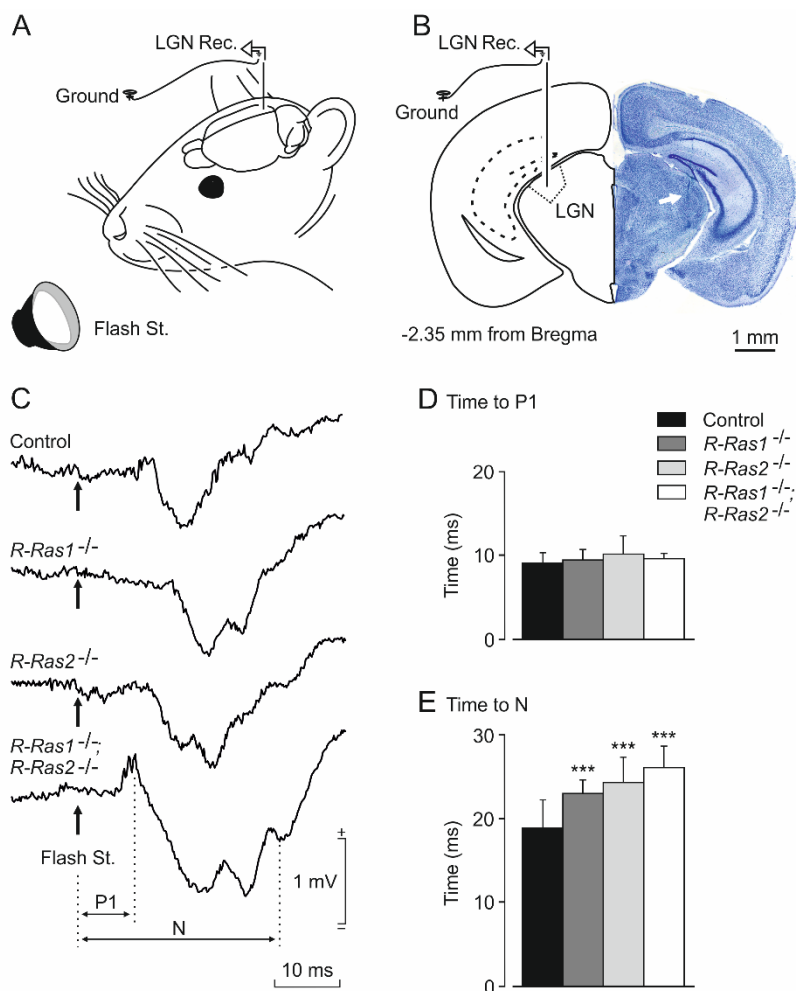


Figura 38. La velocidad de conducción axonal se ve afectada por la ausencia de **R-Ras1** y/o **R-Ras2**. **A**, diseño experimental. Los “alert-behaving mice” reciben un estimulador fótico (flash) a través de un estroboscopio ubicado a 30 cm de ellos. **B**, Electrodo de registro implantados en el núcleo geniculado lateral dorsal izquierdo. La fotomicrografía ilustra la ubicación del electrodo de grabación. **C**, Ejemplos de

potenciales de campo evocados por la estimulación del flash de luz en el núcleo geniculado lateral dorsal. Las grabaciones se promediaron 20 veces y se obtuvieron de los ratones control, *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*. El momento en el que se produce el flash de luz se indica con una flecha. La latencia a P1 y al último componente N del potencial de campo evocado se encuentran indicadas. **D, E**, Aunque no se observaron diferencias significativas para los valores de latencia desde la presentación flash a P1, los valores de latencia hasta el último componente N del potencial del campo evocado fueron significativamente mayores para los tres grupos experimentales (*R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}*) en comparación con los controles, $p < 0.001$. Todos los ratones analizados fueron adultos (P120).

Estos resultados sugieren que R-Ras1 y R-Ras2 tienen funciones cooperativas y no redundantes. En consecuencia, las alteraciones estructurales y electrofisiológicas observadas en los mutantes, revelan que R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para lograr alcanzar la velocidad adecuada para una correcta conducción del impulso nervioso en los tractos mielinizados del SNC.

10. La ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 reduce la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2/MAPK

Está descrito que R-Ras1 y R-Ras2 pueden regular corriente arriba, las rutas de señalización PI3K-Akt (McFall et al., 2001; Rosario et al., 2001; Murphy et al., 2002; Rong et al., 2002; Delgado et al., 2009) y Erk1/2/MAPK (Graham et al., 1994; Movilla et al., 1999; Rosario et al., 1999) (Fig. 34A). El correcto funcionamiento de estas vías, a su vez, es imprescindible para una mielinización adecuada (Goebbels et al., 2010; Fyffe-Maricich et al., 2011; Ishii et al., 2012; Ishii et al., 2013; Ishii et al., 2014; Gaesser and Fyffe-Maricich, 2016; Ishii et al., 2016; Jeffries et al., 2016; Furusho et al., 2017). Por todo ello, decidimos estudiar si una activación deficiente de estas vías podría ser el mecanismo molecular responsable del fenotipo observado en los ratones carentes de R-Ras1 y/o R-Ras2. Así pues, realizamos una serie de Western blot de homogenizados de nervio óptico de ratones adultos P90 con anticuerpos contra los principales efectores de cada una de las vías, observando una disminución en la activación de estas vías.

10.1. La ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 provoca una disminución en la actividad de la vía PI3K/Akt

Los Western blot de homogeneizados de nervio óptico de ratones control, *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} revelaron una disminución en la fosforilación de Akt tanto en la Treonina 308 (T308) como en la Serina 473 (S473) (Fig. 39B, C). La cuantificación de los experimentos realizados, reveló que la T308, fosforilada por PDK1 disminuye su actividad de manera mucho más drástica en el ratón mutante simple carente de R-Ras1, sin embargo, no se observa esa gran disminución en el doble mutante, en el que tanto R-Ras1 como R-Ras2 están ausentes (P-Akt (T308) *R-Ras1*^{-/-} 78,5 ± 6,51% de reducción (p < 0,0001), *R-Ras2*^{-/-} 35,3 ± 12,80% de reducción (p = 0,0035), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 34,5 ± 15,23% de reducción (p = 0,007). En el caso de la S473, fosforilada por mTORC2, vemos una disminución gradual de su activación siendo mucho más acusada en el doble mutante (P-Akt (S473) *R-Ras1*^{-/-} 49,2 ± 1,20% de reducción (p < 0,0001), *R-Ras2*^{-/-} 53,2 ± 15,92% de reducción (p = 0,0044), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 62,9 ± 4,92% de reducción (p = 0,0001), (Fig. 39).

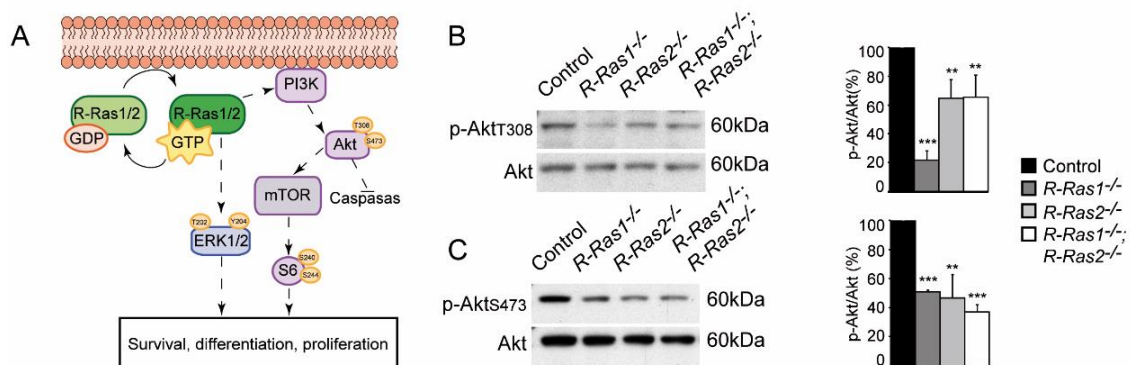


Figura 39. La fosforilación de Akt se ve disminuida en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2. **A,** Esquema simplificado de las rutas PI3-K/Akt y MAPK/Erk1/2 en el que se muestra como R-Ras1 y R-Ras2 regulan estas vías de señalización. Las flechas indican activación y las líneas horizontales inhibición, las líneas discontinuas representan una interacción indirecta. **B,** Western blot realizados con lisados de nervio óptico de ratones adultos (P90) *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-}. La incubación de la membrana con el anticuerpo que reconoce la fosforilación de la T308 de Akt (fosforilación que realiza PDK1) mostró una disminución en la fosforilación de este residuo en todos los genotipos mutantes comparados con el control sin que haya cambios en la cantidad de Akt total (P-Akt (T308) *R-Ras1*^{-/-} 78,5 ± 6,51% de reducción (p < 0,0001), *R-Ras2*^{-/-} 35,3 ± 12,80% de reducción (p = 0,0035), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 34,5 ± 15,23% de reducción (p = 0,007). **C,** Se muestra la incubación de la membrana con el anticuerpo que reconoce las

fosforilación del residuo S473 (fosforilado por mTORC2). Se observa una disminución gradual de la activación de Akt por la fosforilación de este residuo en todos los genotipos mutantes comparados con el control, siendo mucho más acusada en el doble mutante. Akt total no se ve modificada P-Akt (S473) *R-Ras1*^{-/-} 49,2 ± 1,20% de reducción (p < 0,0001), *R-Ras2*^{-/-} 53,2 ± 15,92% de reducción (p = 0,0044), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 62,9 ± 4,92% de reducción (p = 0,0001). Los gráficos muestran el análisis densitométrico de Akt fosforilada en T308 o S473 normalizados a los niveles de proteína total en comparación con los controles (100%, n = 4).

Tras estudiar el grado de activación de Akt, analizamos la actividad de S6K, una quinasa regulada por mTORC1, midiendo el grado de fosforilación de su sustrato S6 en los residuos S240 y S244 (Fig. 40). Confirmamos de esta manera un descenso significativo en la actividad de la vía PI3K/Akt en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 (P-S6 *R-Ras1*^{-/-} 62,6±6,8% reducción (p<0,0001), *R-Ras2*^{-/-} 50,9±15,2% reducción (p=0,0002), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 65,2±23,5% reducción (p=0,0005). (Fig. 40A, B). La disminución en la actividad de Akt se hizo por tanto evidente, midiendo los niveles de fosforilación de S6 en los residuos S240 y S244 (fosforilados por S6K).

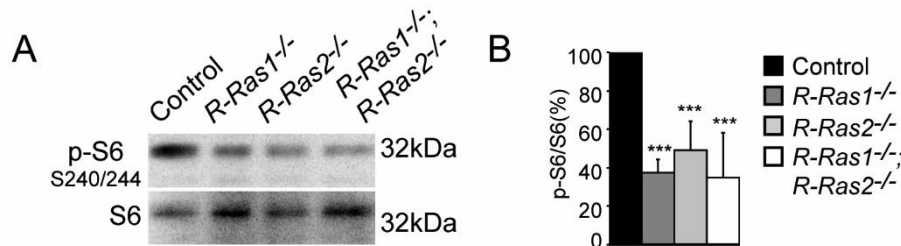


Figura 40. La ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 provoca una disminución en el grado de fosforilación de S6. **A**, Western blot de lisados de nervio óptico de ratones adultos P90 *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} incubados con anti p-S6 y anti S6total que muestra una disminución en la fosforilación de esta proteína en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 comparado con el control. Los niveles totales de S6 no se ven alterados por la ausencia de estas GTPasas. **B**, Las gráficas muestran el análisis densitométrico de la fosforilación de S6 normalizado a los niveles totales de proteína comparados con los controles (100%, n=4). *R-Ras1*^{-/-} 62,6±6,8% reducción (p<0,0001), *R-Ras2*^{-/-} 50,9±15,2% reducción (p=0,0002), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 65,2±23,5% reducción (p=0,0005).

10.2. La ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 provoca una disminución en la actividad de la vía MAPK/Erk1/2

Para abordar esta cuestión, realizamos Western blot de homogeneizados de nervio óptico de ratones adultos P90 *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} y analizamos el grado de fosforilación de Erk1/2 (residuos T202/Y204), efector de la vía MAPK. Los resultados obtenidos mostraron una disminución gradual en la activación de la vía en los ratones mutantes comparados con los controles. Esta disminución fue mucho más drástica en el doble mutante (Fig. 41).

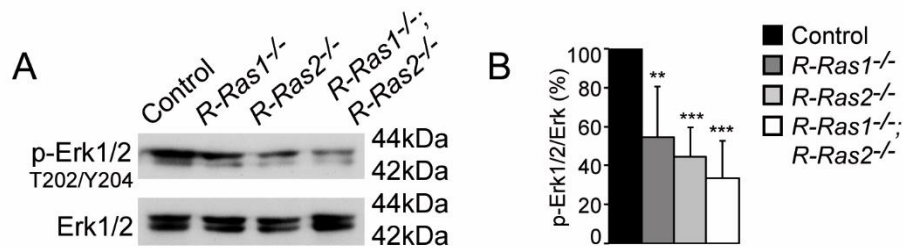


Figura 41. La ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 provoca una disminución en la fosforilación de Erk1/2. **A**, Western blot de lisados de nervio óptico de ratones adultos P90 *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} incubados con anti p-Erk1/2 y anti Erk1/2total que muestra una disminución en la fosforilación de esta proteína en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 comparado con el control. Los niveles totales de Erk total no se ven alterados por la ausencia de estas GTPasas. **B**, Las gráficas muestran el análisis densitométrico de la fosforilación de Erk1/2 normalizado a los niveles totales de proteína comparados con los controles (100%, n=4). *R-Ras1*^{-/-} 45,4±25,8% reducción (p=0,004), *R-Ras2*^{-/-} 55,6±15,3% reducción (p<0,0001), *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} 68,5±20,3% reducción (p<0,0001).

Así pues, la ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 ocasiona la disminución de la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/Erk1/2. La señalización deficiente de estas vías podría ser la causa de la menor supervivencia celular observada y de los defectos en diferenciación de los OLs hallado en los ratones mutantes *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} comparados con los controles. R-Ras1 y R-Ras2 parecen ser esenciales en la supervivencia y diferenciación de los OLs a través de la correcta activación de las vías PI3K/Akt y MAPK/Erk1/2.

11. La función de R-Ras1 y R-Ras2 es específica en mielinización no siendo compensada por otros miembros de la superfamilia

11.1. La función de R-Ras1 y R-Ras2 en mielinización no puede ser suplida por R-Ras3

Para saber si la función de R-Ras1, R-Ras2 o de ambas era específica o podía ser compensada por R-Ras3, realizamos estudios de Western blot de lisados de nervio óptico (Fig. 42A), cuerpo calloso (Fig. 42B) y médula espinal (Fig. 42C). Estos estudios nos permitieron observar que la proteína R-Ras3 no modifica su expresión en ausencia de R-Ras1 (Fig. 42A), de R-Ras2 (Fig. 42A) ni en ausencia de ambos (Fig. 42A, B y C), indicando que R-Ras3 no incrementa su expresión en los ratones *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* ni en los *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*.

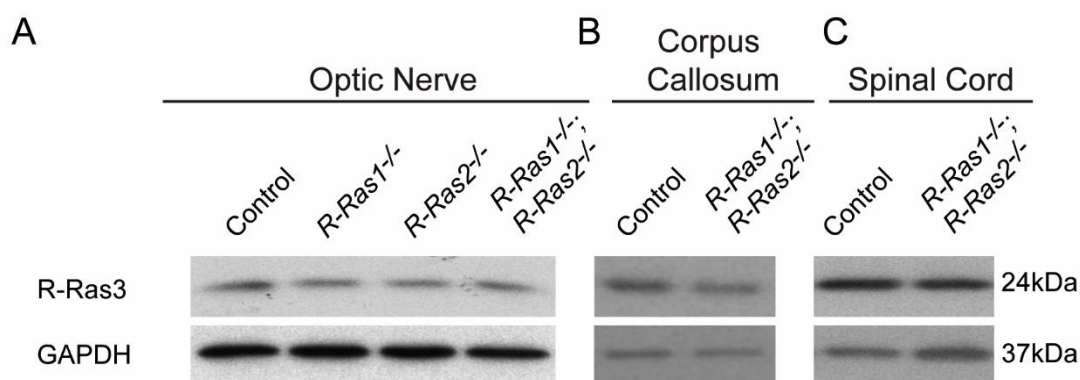


Figura 42. La expresión de R-Ras3 no se modifica en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2.

A, Estudios de Western blot de lisados de nervio óptico de ratones adultos (P90) controles, *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}* que muestran la expresión de R-Ras3 (~24kDa) en este tracto. No se observan diferencias en la expresión de R-Ras3 en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2. **B-C**, Western blot de lisados de cuerpo calloso (B) y médula espinal (C) de ratones adultos (P90) controles, y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}* que muestran que la expresión de R-Ras3 tampoco se modifica en estos dos tractos en ausencia de R-Ras1 y R-Ras2.

Además, estos resultados fueron verificados mediante técnicas de RT-qPCR en nervios ópticos de ratones control, *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}*, confirmando que la expresión de R-Ras3 no se ve modificada en ausencia de estas proteínas (Fig. 43).

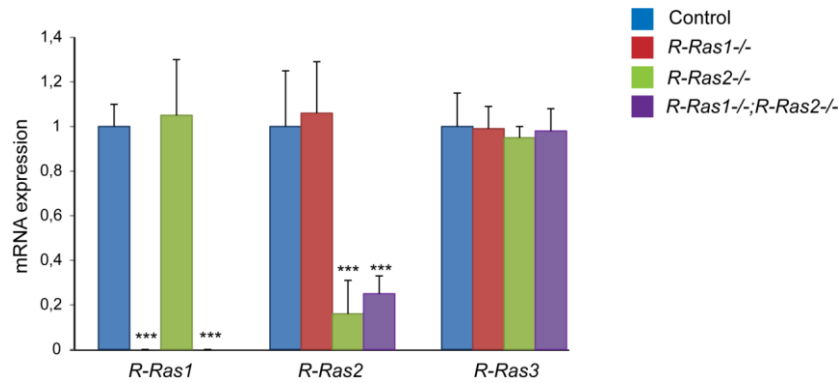


Figura 43. En ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2, R-Ras3 no modifica su expresión. Experimentos de rt-QPCR en los que se muestran la expresión relativa de R-Ras1, R-Ras2 y R-Ras3 en nervio óptico de animales control (azul), *R-Ras1^{-/-}* (Rojo), *R-Ras2^{-/-}* (Verde) y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}* (morado). No se observan diferencias significativas en la expresión de R-Ras3 en ninguno de los mutantes comparados con el control.

11.2. La función de R-Ras1 y R-Ras2 en mielinización no puede ser suplida por las Ras clásicas

Dada la alta homología que los miembros de la subfamilia R-Ras comparten con las Ras clásicas, quisimos comprobar si en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 los miembros de esta subfamilia podrían sobreexpresarse para intentar suplir la carencia de R-Ras1 y/o R-Ras2. Por ello, realizamos estudios de western blot de lisados de nervio óptico (Fig. 44A) e incubamos con un anticuerpo anti pan-Ras. Pudimos observar que estas proteínas no cambian sus niveles de expresión en ausencia de R-Ras1 y/o de R-Ras2 (Fig. 44A). Ratificamos los datos obtenidos por Western blot midiendo los niveles de expresión de *K-Ras*, *N-Ras* y *H-Ras* mediante RT-qPCR en nervios ópticos de ratones control, *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}*, confirmando que la expresión de estas GTPasas no se ve modificada en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 (Fig. 44B).

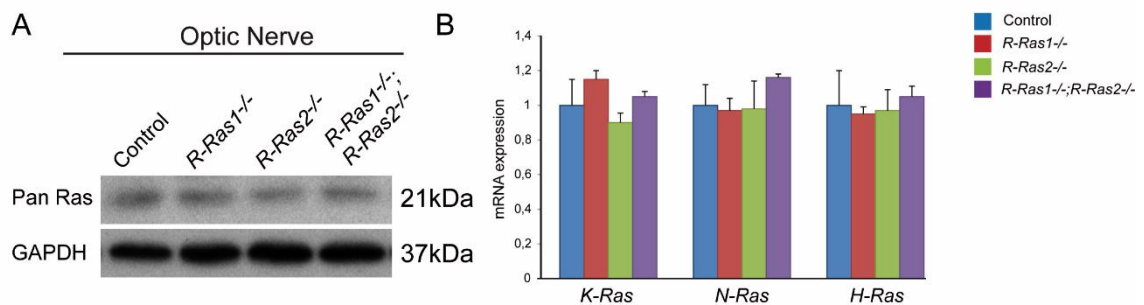


Figura 44. La expresión de las Ras clásicas no se modifica en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2. A, Estudios de Western blot de lisados de nervio óptico de ratones adultos (P90)

controles, *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} que muestran la expresión de las Ras Clásica (~21kDa) en este tracto. No se observan diferencias en la expresión de estas GTPasas en ausencia de R-Ras1, R-Ras2. B, Experimentos de rt-QPCR en los que se muestran la expresión relativa de *K-Ras*, *N-Ras* y *H-Ras* en nervio óptico de animales control (azul), *R-Ras1*^{-/-} (Rojo), *R-Ras2*^{-/-} (Verde) y *R-Ras1*^{-/-}; *R-Ras2*^{-/-} (morado). No se observan diferencias significativas en la expresión de R-Ras3 en ninguno de los mutantes comparados con el control.

Bloque II Perspectivas futuras: Expresión de R-Ras1 y R-Ras2 en distintas regiones del SNC

1. Patrón de expresión de R-Ras1 y R-Ras2 en el SNC

Poco se sabe sobre la distribución de R-Ras1 y R-Ras2 en regiones concretas del SNC. Por ello realizamos estudios de Western blot en lisados de las siguientes regiones: nervio óptico (en la figura ON), cuerpo calloso (en la figura CC), corteza (en la figura CX), hipocampo (en la figura HP), tálamo-hipotálamo (en la figura THT), cerebelo (en la figura CB) y médula espinal (en la figura SC) de ratones adultos (figura 45). Estos estudios mostraron que estas proteínas presentan diferentes niveles de expresión en el SNC. Sorprendentemente, se observó una alta expresión de ambas proteínas en cuerpo calloso y cerebelo seguida de corteza e hipocampo. Se observaron menores niveles en nervio óptico, tálamo-hipotálamo y médula espinal. Se utilizaron como controles de especificidad lisados de SC de ratones *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-};*R-Ras2*^{-/-} (Fig. 45).

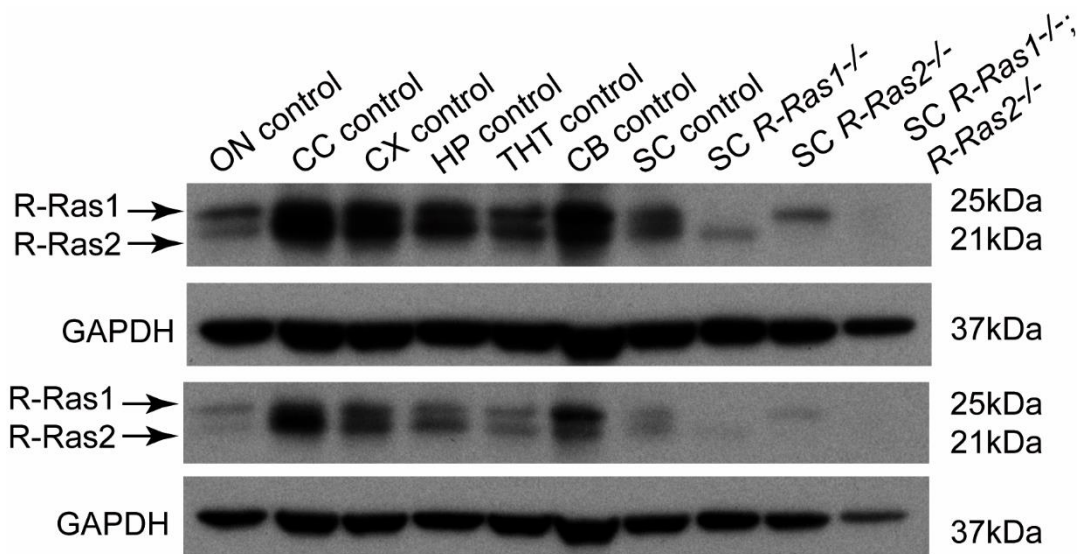


Figura 45. Expresión de R-Ras1 y R-Ras2 en distintas regiones del SNC. Western blot a partir de lisados de ON, CC, CX, HP, THT, CB y SC de ratones adultos P90 control y lisados de SC de ratones *R-Ras1*^{-/-}, *R-Ras2*^{-/-} y *R-Ras1*^{-/-};*R-Ras2*^{-/-} que muestran que ambas proteínas están presentes en mayor o menor medida en todas estas regiones del SNC del ratón. Se utilizó el anticuerpo anti R-Ras que reconoce ambas proteínas específicamente.

Para ratificar estos resultados, realizamos estudios de RT-qPCR de estas regiones donde vimos que tanto R-Ras1 como R-Ras2 tienen una expresión similar en cerebelo, cuerpo calloso y en corteza, mientras que R-Ras2 parece tener niveles de expresión algo mayores en hipocampo y talamo-hipotálamo, y R-Ras1 parece tener mayores niveles de expresión en médula.

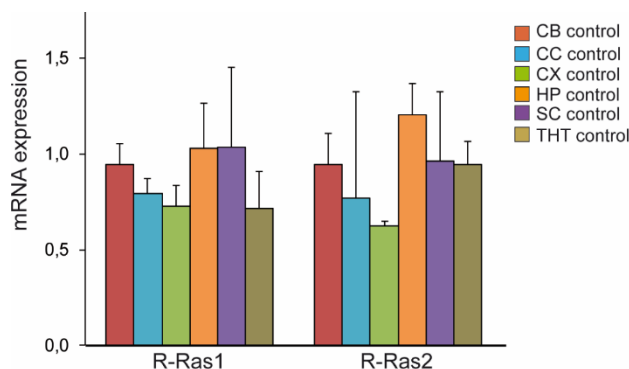


Figura 46. Experimentos de RT-qPCR en los que se muestran la expresión relativa de *R-Ras1* y *R-Ras2* en *CB*, *CC*, *CX*, *HP*, *SC* y *THT* de animales control.

Por lo tanto, R-Ras1 y R-Ras2 se expresan además de en nervio óptico, médula y cuerpo calloso, en corteza hipocampo, tálamo-hipotálamo y cerebelo. Estos resultados sugieren para R-Ras1 y R-Ras2 una función adicional, a la anteriormente descrita para los tractos mielinizados SNC.

Posteriormente, quisimos identificar los tipos celulares concretos en los que se expresaban R-Ras1 y R-Ras2. Está descrito que R-Ras1 se expresa en neuronas corticales e hipocampales (Ivins et al., 2000; Negishi et al., 2005; Oinuma et al., 2007; Iwasawa et al., 2012) además de en OLS (Olsen and Ffrench-Constant, 2005). Para estudiar específicamente la expresión de R-Ras2 en estas regiones concretas del SNC, recurrimos al ratón *R-Ras2*^{-/-} que tiene como reportero el gen *LacZ* que codifica para β -galactosidasa. Realizamos tinciones con el reactivo X-gal en cortes coronales de ratones *R-Ras2*^{-/-}. Este reactivo, en presencia de la β -galactosidasa, produce un compuesto azul insoluble permitiendo la identificación de las áreas donde se expresaría R-Ras2. Identificamos, de este modo, una alta expresión de R-Ras2 en corteza (Fig. 47A, A'), en hipocampo (Fig. 47A, B') y en retina (Fig. 48B). En corteza, se observó un aumento de la reactividad a las láminas superiores. En hipocampo la reactividad fue mayor en CA1 y en giro dentado (GD). En retina se observó un punteado compatible con las células ganglionares de la retina (CGR).

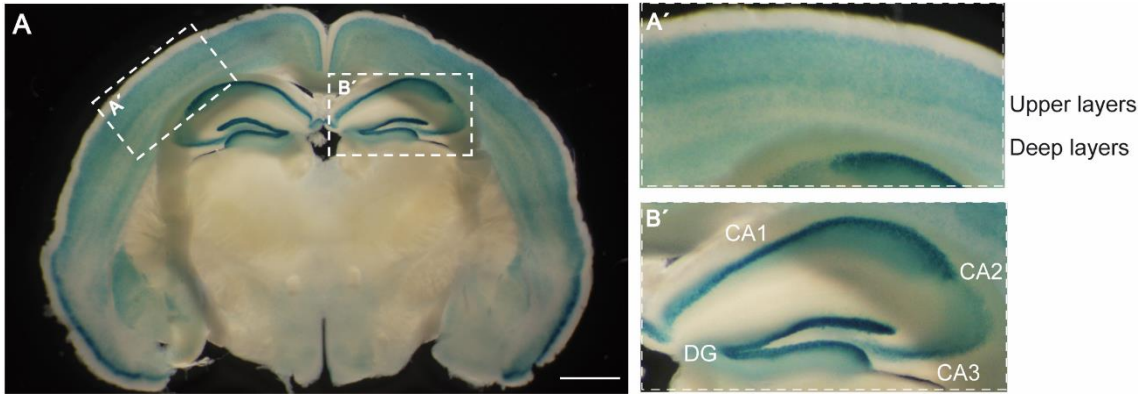


Figura 47. R-Ras2 se expresa en corteza e hipocampo. *A*, Corte coronal a vibrátomo de 300 micras, del cerebro en fresco de un ratón adulto *R-Ras2^{-/-}*, sobre el que se ha realizado la reacción X-Gal produciéndose un precipitado azul en aquellos lugares donde se expresaría R-Ras2. El recuadro indica donde se ha tomado la foto del inserto ampliada, en este caso el inserto corresponde a la corteza (*A'*) y al hipocampo (*B'*). *A'*, Ampliación del córtex. Se observa una tinción más intensa en las láminas superiores (II-IV) *B'*, Ampliación de la tinción en el HP donde se detallan las áreas correspondientes a CA1, CA2, CA3 y DG. n=3. Barras de escala: 2mm.

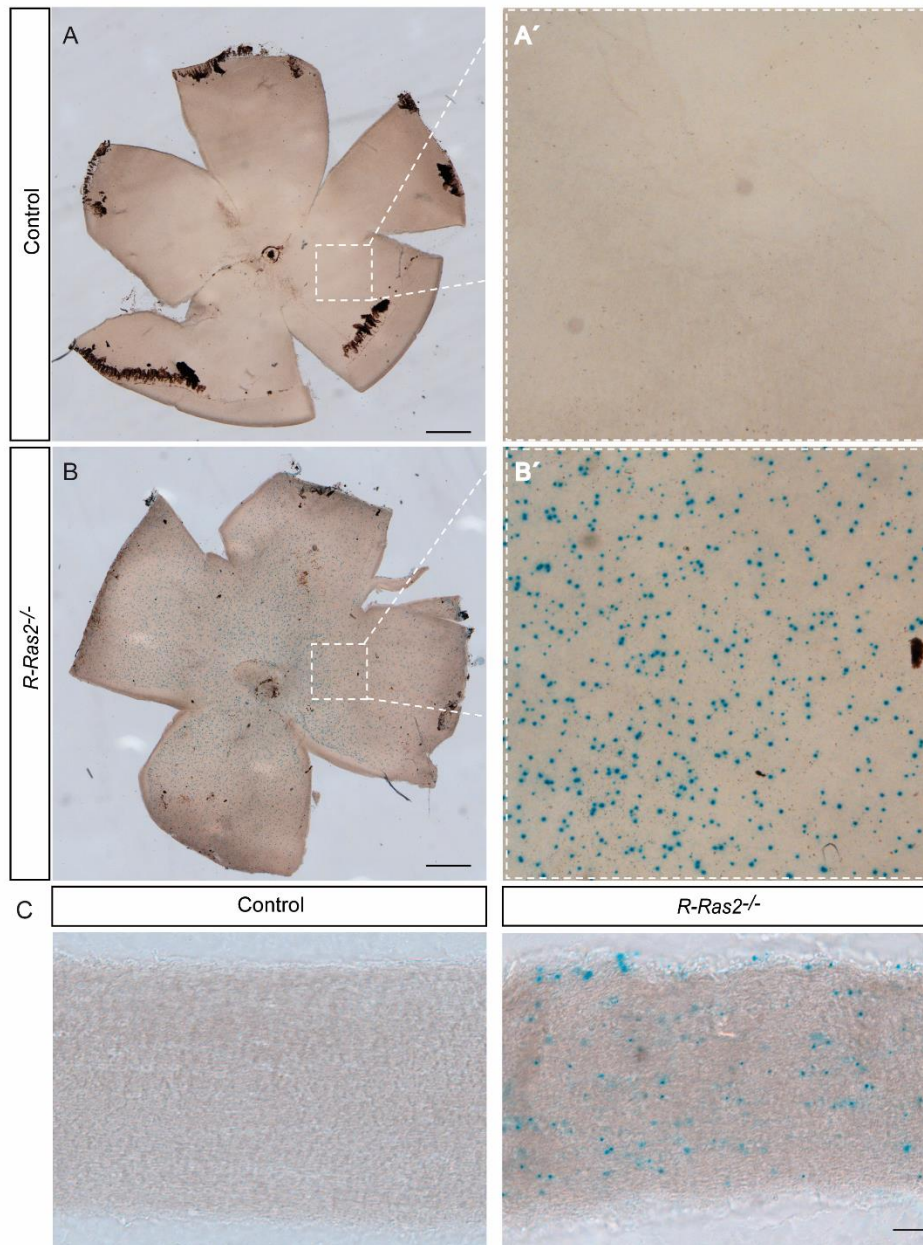
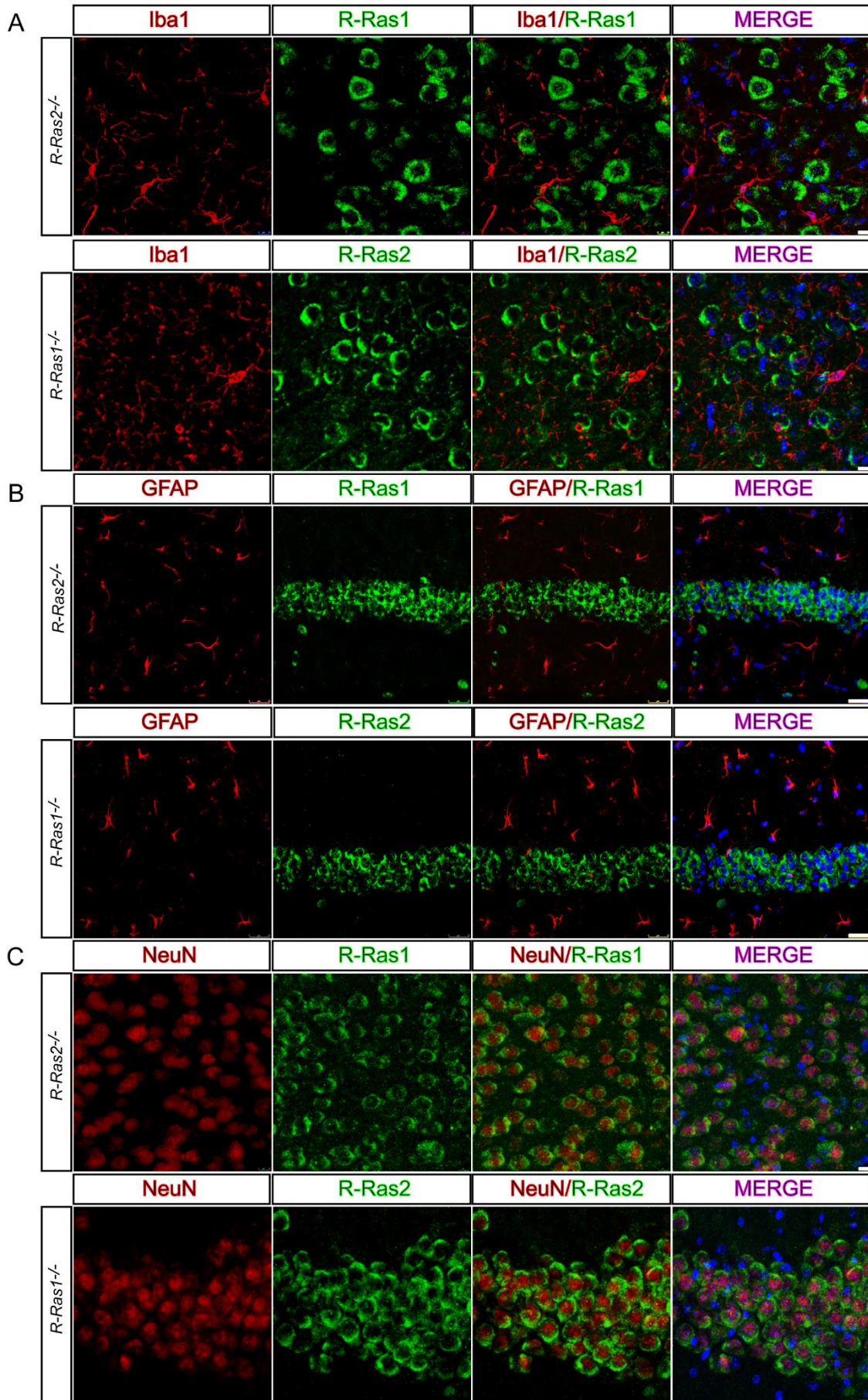


Figura 48. R-Ras2 se expresa en retina. *A-B*, Retinas montada en flat de ratones adultos *R-Ras2^{-/-}* (*B*) y controles (*A*) sobre las que se ha realizado la reacción X-Gal. La tinción revela que R-Ras2 se expresa en retina no hallándose uniones inespecíficas del reactivo en el control. Los recuadros muestran los lugares donde se ha realizado la ampliación que figura a la derecha de cada una de las fotos. *A'-B'*, Ampliación de las áreas indicadas a mayores aumentos. *C*, Tinción con el reactivo X-Gal en secciones longitudinales de nervio óptico. Barras de escala: 500 μ m en *A*, *B* y 75 μ m en *C*.

2. R-Ras1 y R-Ras2 son expresados por neuronas, pero no por astrocitos o microglia

Tras haber identificado las áreas donde se expresan R-Ras1 y R-Ras2 en SNC, decidimos estudiar en qué tipos celulares se expresaban estas proteínas. Realizamos dobles tinciones inmunohistoquímicas en cortes coronales de ratones adultos (P90) *R-Ras1^{-/-}* y *R-Ras2^{-/-}* con los anticuerpos anti R-Ras2 o anti R-Ras1 respectivamente y marcadores específicos de los distintos tipos celulares. Para identificar la posible expresión de R-Ras1 y/o R-Ras2 en microglía utilizamos el marcador de membrana Iba1 (del inglés “Ionized calcium binding adaptor molecule 1”). Esta doble tinción inmunohistoquímica mostró que R-Ras1 y R-Ras2 no se expresan en microglia. De igual manera, para identificar a los astrocitos utilizamos un anticuerpo monoclonal contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Estas tinciones demostraron que R-Ras1 y R-Ras2 no se expresan en astrocitos. Finalmente, para la identificación de neuronas utilizamos el marcador nuclear NeuN (del inglés “Neuronal Nuclei”). Estas tinciones demostraron que tanto R-Ras1 como R-Ras2 se expresan en neuronas (Fig. 49C) sugiriendo un posible papel de estas GTPasas en neuronas además del ya descrito en OLs. Estos datos abren un nuevo frente de investigación en el que estudiaremos la posible función de R-Ras1 y R-Ras2 en neuronas.



Resultados

Figura 49. R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en neuronas, pero no en astrocitos ni microglía. **A**, Dobles tinciones inmunohistoquímicas realizada en cortes coronales de cerebros de ratones adultos *R-Ras1*^{-/-} (abajo), *R-Ras2*^{-/-} (arriba) con los anticuerpos anti R-Ras1 (arriba, verde) o anti-R-Ras2 (abajo, verde) e Iba 1 (rojo). Ninguna de las dos GTPasas coincide con el marcador Iba1 por lo que R-Ras1 y R-Ras2 no se expresan en microglía. **B**, Dobles tinciones inmunohistoquímicas realizada en cortes coronales de cerebros de ratones adultos *R-Ras1*^{-/-} (abajo) y *R-Ras2*^{-/-} (arriba) con los anticuerpos anti R-Ras1 (arriba, verde) o anti-R-Ras2 (abajo, verde) y anti-GFAP (rojo). Estas GTPasas no se expresan en astrocitos. **C**, Dobles tinciones inmunohistoquímicas realizada en cortes coronales de cerebros de ratones adultos *R-Ras1*^{-/-} (abajo) y *R-Ras2*^{-/-} (arriba) con los anticuerpos anti R-Ras1 (arriba, verde) o anti-R-Ras2 (abajo, verde) y NeuN (rojo). Ambas proteínas se expresan en neuronas. n=4. Barras de escala: 10µm en A y C. 25 µm en B.

Discusión

DISCUSIÓN

En este trabajo, proporcionamos las primeras evidencias *in vivo* de que R-Ras1 y R-Ras2 juegan un papel esencial en los procesos de mielinización, al participar en el control de la supervivencia y diferenciación de los OLs. Nuestros datos demuestran, que los ratones carentes de R-Ras1 y/o R-Ras2 sufren hipomielinización en los principales tractos mielinizados del SNC. Esta hipomielinización se caracteriza por un empobrecimiento de las vainas de mielina (internodos), acompañado de una disminución en la longitud de las mismas. Estas alteraciones tienen repercusiones fisiológicas ya que, en ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 se produce una reducción en la velocidad de conducción del impulso nervioso, pudiendo causar defectos en la integración de la información sensorial, motora y cognitiva.

R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en los oligodendrocitos de los principales tractos mielinizados del SNC

Inicialmente demostramos que R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en los OLs de los principales tractos mielinizados del SNC. Dada la homología de secuencia aminoacídica entre ambas (65%), los anticuerpos dirigidos contra estas GTPasas reconocen tanto a R-Ras1 como a R-Ras2. Sin embargo, debido a las pequeñas diferencias de movilidad electroforética entre ambas pudimos identificarlas sin problema mediante Western blot, confirmando la presencia de ambas GTPasas en los principales tractos mielinizados del SNC (Fig. 17A, B, C). Además, gracias a las potentes herramientas de las que disponemos en el laboratorio que son los ratones *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* pudimos identificar inequívocamente la expresión tanto de R-Ras1 como de R-Ras2 en OLs mediante tinciones inmunohistoquímicas (Fig. 18). Cabe destacar que, los anticuerpos reconocen a R-Ras1 y a R-Ras2, no mostrando inmunorreactividad con otros miembros de la subfamilia Ras (Fig. 17A y 18).

R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para mantener la población oligodendrocitaria de los principales tractos mielinizados del SNC.

La pérdida de R-Ras1 o R-Ras2 produjo una reducción de la población de OLs (Fig. 19A). El doble mutante mostró el fenotipo más severo con una reducción oligodendrocitaria del 45% aproximadamente con respecto al control (Fig. 19A, C). Por ello, consideramos que R-Ras1 y R-Ras2 son incapaces de compensar el uno la función del otro miembro de la subfamilia, lo que sugiere que R-Ras1 y R-Ras2 actúan de manera cooperativa manteniendo la población oligodendrocitaria.

R-Ras1 y R-Ras2 no están implicados en la generación ni en la proliferación de los OPCs, pero sí en su supervivencia.

La disminución de OLs observada en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2 no se debe a una menor génesis o proliferación de OPCs y tampoco a una migración incorrecta (Fig. 20), sino que parece ser el fruto de una menor supervivencia de los mismos (Fig. 21). En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 se produjo un aumento drástico del número de células que sufrían apoptosis a P30, momento en el cual, los OPCs que no han encontrado el axón a mielinizar, sufrirán apoptosis de manera fisiológica (Barres et al., 1992; Butts et al., 2008). Para saber si la disminución en el número de OLs era debida a un aumento en la apoptosis de los mismos, realizamos tinciones con anti caspasa 3 activa que demostraron un aumento en la apoptosis en los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* comparados con los controles (Fig. 21). Por un lado, para poder verificar si el tipo celular que estaba sufriendo apoptosis eran OLs, realizamos dobles tinciones con anti Olig2/Caspasa3-activa (Datos no mostrados). Por otro lado, para poder discriminar si los OLs sufriendo apoptosis eran ya OLs maduros o por el contrario se trataba de oligodendroglia en desarrollo realizamos tinciones con anti-CC1/Caspasa3-activa (Datos no mostrados). Desafortunadamente, el proceso de apoptosis (células Caspasa3-positivas) causa la pérdida de expresión de otros marcadores celulares como CC1 u Olig2, por lo que no pudimos comprobar la existencia de expresión conjunta de caspasa3-activa con CC1 u Olig2. Por lo tanto, no pudimos identificar el estadio madurativo de los OLs que estaban sufriendo apoptosis. Aun así, proponemos que las células apoptóticas que encontramos a P30 eran células oligodendrogiales ya que, R-Ras1 y R-Ras2 sólo se expresen en neuronas y OLs (Figs. 18 y 49), por lo que la pérdida de R-Ras1 y R-Ras2 debería afectar principalmente a estos dos tipos celulares. No se observó disminución en el número de neuronas, por lo que la única población que disminuye con respecto al control son los OLs (Fig. 19). Por todo ello, podemos afirmar que la ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 provoca un aumento en el número de células oligodendrogiales que sufren apoptosis, mermando así, la población de OLs en los ratones adultos *in vivo*.

R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para una correcta mielinización.

El análisis histológico del cuerpo calloso de los ratones *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* comparado con los ratones control, reveló una disminución muy acusada en el grosor promedio del cuerpo calloso de los dobles mutantes, no encontrándose una reducción en el número de axones que cruzan este tracto (Fig. 22). Por lo tanto, atribuimos la reducción de la anchura del cuerpo calloso en los dobles mutantes a un déficit en la cantidad de mielina. Comprobamos la disminución de mielina mediante la realización de tinciones inmunohistoquímicas con anti-MBP tanto en cuerpo calloso

(Fig. 23A) como en nervio óptico (Fig. 23, B) que confirman una drástica reducción de la cantidad de mielina que envuelve a los axones en los dobles mutantes. También realizamos una serie de Western blot para cuantificar la pérdida de mielina, analizando las proteínas MBP y MAG en el nervio óptico y en el cuerpo calloso (Fig. 24). De esta manera, confirmamos que, tanto en los ratones mutantes simples como en el doble mutante, existe una disminución en la cantidad de mielina.

Para analizar cómo esta disminución en la cantidad de mielina estaba afectando a los axones, realizamos análisis de microscopía electrónica de secciones transversales de nervio óptico de ratones adultos (P90) (Fig. 25A). El estudio del g-ratio, confirmó que los axones de los ratones mutantes están rodeados por una menor cantidad de mielina con respecto al control (Fig. 25B). Sin embargo, aunque en ambos mutantes simples se observó un aumento significativo del g-ratio, que implica una menor vaina de mielina rodeando a los axones, se observaron diferencias en sus perfiles de g-ratio. Concretamente, en el *R-Ras2*^{-/-} se observan dos poblaciones diferenciadas de axones mielinizados (Fig. 25B). Esto podría sugerir un papel específico para cada una de estas GTPasas en subpoblaciones específicas de OLs. Novedosos experimentos en los últimos años, han demostrado que los OLs son una población heterogénea (Garcia-Marques et al., 2014; Marques et al., 2016). La ausencia de R-Ras2 pone de manifiesto la existencia de diferentes subpoblaciones de OLs, más o menos susceptibles a su pérdida.

La cuantificación del porcentaje de axones mielinizados en el nervio óptico, puso de manifiesto que en los ratones *R-Ras2*^{-/-} y en los dobles mutantes existe un gran porcentaje de axones desmielinizados (Fig. 27) (*R-Ras2*^{-/-} 30% y *R-Ras1*^{-/-};*R-Ras2*^{-/-} 75%). No se encontraron diferencias en el porcentaje de axones mielinizados en los ratones *R-Ras1*^{-/-} con respecto al control, aunque estos mutantes mostraban un déficit de mielina (Fig. 24A, C, 25A, B y 26). Por tanto, aunque los ratones *R-Ras1*^{-/-} no presentan una disminución en el porcentaje de axones mielinizados (Fig. 27), sí muestran una disminución en el número de envueltas de mielina que los recubren con respecto a los ratones control (Fig. 24,24,26,28).

A pesar de esta disminución en el espesor de la mielina en los ratones mutantes, no observamos alteraciones en el grado de compactación de las vainas (Fig. 28). Estos resultados sugieren que el mecanismo responsable del ensamblaje de vainas de mielina alrededor de los axones es independiente de R-Ras1 y R-Ras2.

Nuestros ratones mutantes presentan hipomielinización en axones de todos los calibres. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 encontramos axones con diámetros menores, en detrimento de los de mayor diámetro (Fig. 29), este hecho coincide con los hallazgos presentados por otros grupos que describen cómo el espesor de la vaina de mielina producida por los OLs condicionan el calibre

del axón (Hildebrand and Hahn, 1978; de Waegh et al., 1992; Hildebrand et al., 1993; Sanchez et al., 1996; Goebbels et al., 2010).

R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta diferenciación de los OLs.

Dado que, los defectos en la diferenciación y maduración de los OLs dificultan la mielinización (Wolswijk, 1998; Kuhlmann et al., 2008; Kremer et al., 2011) y teniendo en cuenta la severa hipomielinización presente en los ratones carentes de R-Ras1 y/o R-Ras2, decidimos estudiar los posibles defectos en diferenciación de los OLs en los ratones dobles mutantes, en los que el fenotipo hipomielinizante es más acusado. Estos estudios, mostraron tanto *in vivo* como *in vitro* diferencias en el grado de diferenciación y maduración de los OLs en los ratones carentes de R-Ras1 y R-Ras2 (Fig. 30,31,32,33). Los estudios realizados *in vivo* mostraron un aumento en el número de OLs pre-mielinizantes, identificados como Tcf4 positivos, en los dobles mutantes comparados con los controles. Esta inmadurez en los OLs se observó tanto a P15, momento de mielinización activa, como a P30 y P120, cuando la mielinización ya ha terminado. Estos estudios demostraron que los OLs en los ratones dobles mutantes son más inmaduros que los de los ratones control (Fig. 31). De hecho, a P120 observamos una disminución en el porcentaje de OLs maduros, marcados como CC1 positivos (Fig. 32). Las tinciones con Tcf4 y CC1 confirman un mayor número de OLs inmaduros en detrimento de los OLs maduros mielinizantes en los dobles mutantes comparados con los controles.

Está descrito, que los OPCs experimentan cambios morfológicos estereotipados a medida que se diferencian (Kremer et al., 2009). Concretamente, los OLs son capaces de diferenciarse *in vitro*, en ausencia de neuronas gracias a las características intrínsecas que poseen (Dubois-Dalcq et al., 1986; Bechler et al., 2015). Estas células oligodendrogiales en cultivo, extienden sus procesos celulares hasta adquirir una morfología muy ramificada (Ishii et al., 2012; Zuchero et al., 2015). Los cultivos enriquecidos de OLs realizados, no tenían neuronas ni fibras susceptibles de ser mielinizadas, no existiendo, por tanto, una comunicación axo-glial. Este hecho, nos permitió evaluar las características intrínsecas de los OLs. En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 los OLs *in vitro* formaban una red de procesos mucho más simple que la observada en los OLs control (Fig. 33), sugiriendo que la pérdida de R-Ras1 y R-Ras2 altera la maduración de los OLs de manera intrínseca *in vitro*. Por tanto, los experimentos *in vivo* e *in vitro* demuestran un aumento en el número de OLs inmaduros acompañado de una disminución en el número de OLs maduros.

En ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 se produce una reducción del 40% en el número de OLs (Fig. 19). La población de OLs que sobreviven, está constituida por OLs inmaduros y, por tanto, incapaces de mielinizar apropiadamente los axones (Fig. 31, 32, 33). Esta podría ser la causa que explica que únicamente el 25% de los axones estén mielinizados (Fig. 27).

R-Ras1 y R-Ras2 modifican el tamaño y el número de los nódulos de Ranvier y la velocidad de conducción del axón en el nervio óptico.

En la eficacia de la transmisión neural participan variables específicas, como el grosor de la mielina, la longitud del nodo y del internodo (Waxman, 1980, 1997; Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008; Bekku et al., 2010). La hipomielinización se correlaciona con velocidades de conducción más lentas, como se describe en otros modelos de ratón que sobreexpresan o carecen de distintas proteínas de mielina (Robaglia-Schlupp et al., 2002; Michailov et al., 2004; Lee et al., 2011). Esta disminución en la velocidad de conducción producida como resultado de la hipomielinización, se asocia a estructuras nodales y paranodales anormales (Tanaka et al., 2009; Lee et al., 2011). Nuestros datos demuestran que la hipomielinización producida por la ausencia de R-Ras1 y R-Ras2, va acompañada de alteraciones en la longitud de los nódulos de Ranvier (Fig. 36B), junto con un aumento de los mismos (Fig. 34C), demostrando de forma indirecta una menor longitud de los internodos (Fig. 37). Todo esto justifica la disminución en la velocidad de conducción observada mediante los experimentos de electrofisiología *in vivo* realizados en el tracto óptico (Fig. 38). Aun así, no podemos descartar que la ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 afecte a otros factores como la distribución de canales iónicos u otras proteínas estructurales en las regiones nodales o paranodales.

La ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 reduce la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2/MAPK.

Las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2 están implicadas en los procesos de mielinización. El aumento de la actividad de la ruta PI3K/Akt, ya sea inhibiendo PTEN o activando constitutivamente Akt en OLs, produce hipermielinización sin alterar la proliferación de OPCs o el número final de OLs maduros (Flores et al., 2008; Goebbels et al., 2010). Además, una señalización alterada por parte de PI3K/Akt afecta la diferenciación de los OLs. Específicamente, la inhibición de mTOR, un efector de esta ruta, bloquea la diferenciación de OLs dejándolos en un estado de OLs pre-mielinizantes asociado con una falta de producción de mielina (Tyler et al., 2009; Gaesser and Fyffe-Maricich, 2016). Del mismo modo, la sobreactivación de la vía Erk1/2/MAPK en OLs provoca hipermielinización en los principales tractos del SNC (Ishii et al., 2013). Por el contrario, la pérdida de Erk1/2 en OLs maduros disminuye la cantidad de mielina acompañada de una reducción en el tamaño de la población de OLs, debido a una disminución en la supervivencia de los mismos (Ishii et al., 2014). Hemos demostrado la reducción en la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2/MAPK en ausencia de R-Ras1y/o R-Ras2 (Fig. 39, 40, 41). La regulación a la baja de estas vías de señalización podría ser la

responsable de la hipomielinización observada en los ratones *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* al estar estas vías implicadas en los procesos de supervivencia y diferenciación de los OLs (Ness et al., 2002; Romanelli et al., 2009; Ishii et al., 2014; Murcia-Belmonte et al., 2014; Gaesser and Fyffe-Maricich, 2016; Murcia-Belmonte et al., 2016) (Fig. 51). El fenotipo descrito en los ratones mutantes *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* podría ser el resultado del efecto combinado de la menor activación de las rutas PI3K/Akt y Erk1/2/MAPK. Con respecto a la ruta PI3K/Akt, los Western blot de homogeneizados de nervio óptico de ratones control, *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* revelaron una disminución en la fosforilación de Akt tanto en su residuo T308 como en el S473 (Fig. 39B, C). Sorprendentemente, se observó una disminución más acusada de la fosforilación en el residuo T308, sustrato de PDK1, en el ratón mutante *R-Ras1^{-/-}* (Fig. 39B). Para que Akt esté completamente activa, debe darse la fosforilación de ambos residuos, T308 y S473. Sin embargo, parece haber un umbral por encima del cual Akt permanece activo normalmente, lo que sugiere que el diferente grado de fosforilación de Akt en los residuos S473 o T308 es independiente del grado de activación de esta quinasa. Estas fosforilaciones no parecen tener un efecto aditivo. De hecho, la fosforilación de T308 podría ser compensada por la fosforilación en S473 y viceversa, manteniendo de esta manera la activación general de Akt. Sin embargo, la fosforilación diferencial de T308 y S473 sí puede determinar la especificidad de Akt para sus sustratos. Por su parte, los ratones *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}* mostraron la misma reducción en la fosforilación de S6 (Fig. 40), indicando que la disminución de la activación de la vía PI3K/Akt es equivalente tanto en los mutantes simples como en el doble (Fig. 50). Esto indica que, la gran disminución observada en la fosforilación de Akt en T308 presentada por *R-Ras1^{-/-}*, no pareció tener un efecto proporcional en la activación de la vía PI3K-Akt. Una explicación posible sería que, la fosforilación en S473 sea capaz de compensar la falta de fosforilación en T308, haciendo que la actividad de la ruta PI3K-Akt se vea igualmente afectada en los mutantes simples y el doble (Fig. 50).

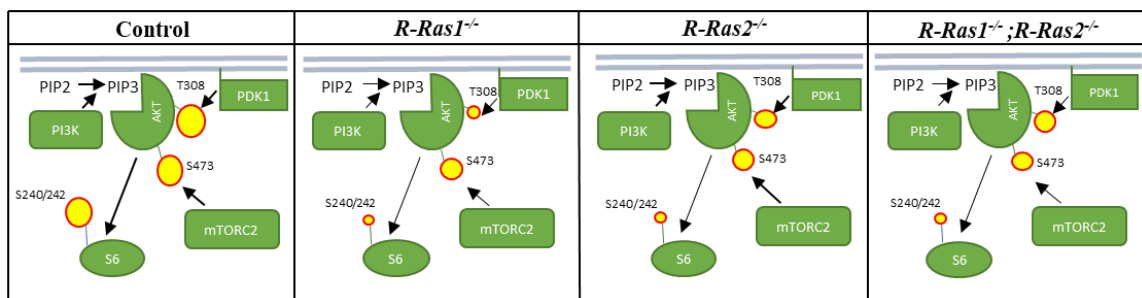


Figura 50. Representación esquemática de la ruta molecular PI3K-Akt en los diferentes ratones mutantes *R-Ras1^{-/-}*, *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-};R-Ras2^{-/-}*, en comparación con el control. El tamaño del círculo amarillo representa el grado de fosforilación de los

residuos indicados. Aunque el ratón *R-Ras1^{-/-}* mostró una disminución más acusada en la fosforilación de AktT308 en comparación con los ratones *R-Ras2^{-/-}* y *R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}*, la disminución en la fosforilación de S6 es equivalente en los tres ratones mutantes. Por tanto, la vía de señalización PI3K/Akt está igual de afectada en ausencia de R-Ras1 y/R-Ras2.

Respecto a la vía Erk1/2/MAPK, hasta la fecha, experimentos *in vitro* sugerían que R-Ras1 no era capaz de activar la cascada de señalización Raf-MEK-ERK (MAPK), al menos en fibroblastos, por ser incapaz de unirse a Raf (Rodríguez-Viciana et al., 2004). Sin embargo, basándonos en nuestros datos, pensamos que tanto R-Ras1 como R-Ras2 participan en la regulación de la activación de ambas vías orquestando adecuadamente la señalización a través de las mismas, y manteniendo así, no solo la supervivencia sino también la correcta diferenciación de los OLS.

La función de R-Ras1 y R-Ras2 es específica en mielinización no siendo compensada por otros miembros de la superfamilia.

Los estudios de Western blot y RT-qPCR pusieron de manifiesto que en ausencia de R-Ras1 y/o R-Ras2, el otro miembro de la subfamilia, R-Ras3 no modifica su expresión (Fig. 42, 43). Aunque no se han llevado a cabo estudios de función de esta GTPasa, el fenotipo observado junto con el patrón de expresión nos lleva a pensar que R-Ras3 no es capaz de suplir la función que cumplen R-Ras1 y R-Ras2 en la mielinización. Además, esta misma afirmación puede extrapolarse a las Ras clásicas. A pesar de la alta identidad de secuencia que comparten K, N y sobre todo H-Ras con R-Ras1 y R-Ras2, las Ras clásicas no son capaces de suplir la carencia de R-Ras1 y R-Ras2 (Fig. 44). Estos datos, refutan la idea ampliamente extendida de que estas pequeñas GTPasas desempeñan papeles redundantes en los diversos tipos celulares en los que se expresan. En este trabajo, queda patente que, R-Ras1 y R-Ras2 cooperan para una correcta mielinización, no pudiendo ser suplidos por ningún otro miembro de esta superfamilia.

En resumen, R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la supervivencia y diferenciación de los OLs a través de la regulación de la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2/MAPK (Fig. 51A). La ausencia de estas proteínas origina una disminución en la población de OLs en los diferentes tractos mielinizados del SNC, debida a una mayor tasa apoptótica (Fig. 51A). Además, los OLs que sobreviven, son en su mayoría inmaduros e incapaces de mielinizar correctamente (Fig. 51C). Por ello, los ratones mutantes carentes de R-Ras1 y R-Ras2 presentan una hipomielinización muy acusada. Esta hipomielinización, va acompañada de alteraciones en la longitud de los nódulos de Ranvier, junto con un aumento de los mismos, demostrando de forma indirecta una menor longitud de los internodos (Fig. 51C). Todas estas alteraciones justifican la disminución en la velocidad de conducción observada.

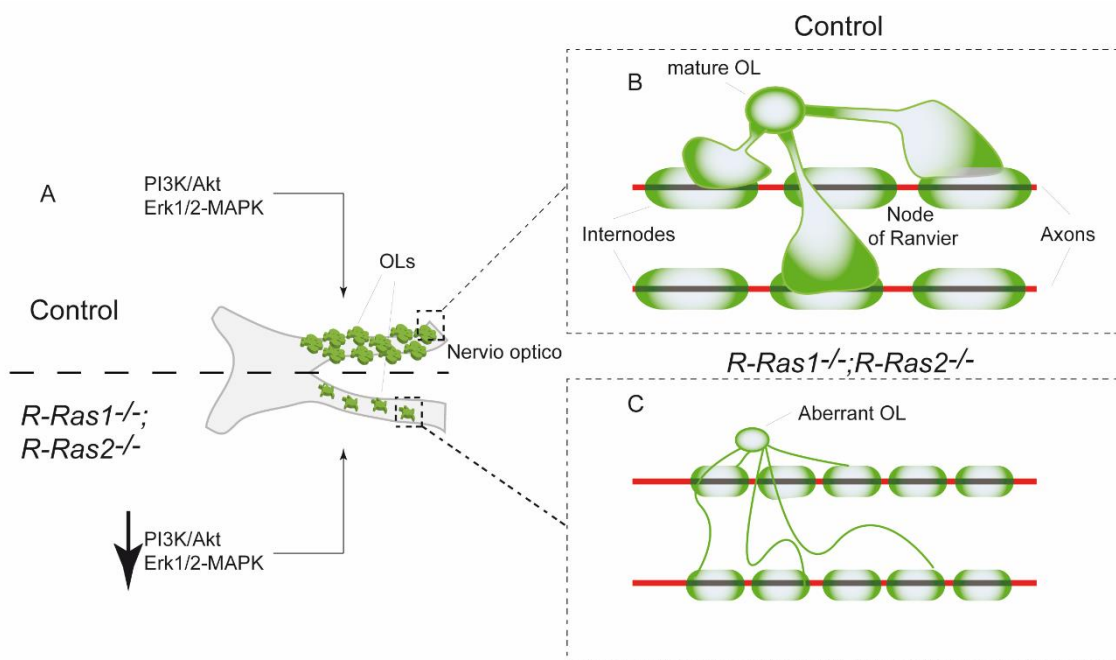


Figura 51: A-C, Ilustración de un quiasma con dos nervios ópticos (ON), el de arriba correspondería con un ON control y el de abajo con el ON de un ratón mutante $R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}$. La ausencia de R-Ras1 y R-Ras2 (ON abajo) provoca una disminución en el número de OLs en comparación con los ratones control (ON arriba). Los OLs que logran sobrevivir, son además inmaduros (C), debido a una deficiencia en la señalización de las vías PI3K/AKT y Erk1/2- MAPK (A parte de abajo). Por todo ello, los OLs presentes en los tractos mielinizados de los ratones $R-Ras1^{-/-}; R-Ras2^{-/-}$ son inmaduros y aberrantes (C), incapaces por ello de mielinizar correctamente. Generan más vainas, más estrechas y más cortas, provocando un retraso en la transmisión de la señal eléctrica.

Bloque II: Perspectivas futuras

Patrón de expresión de R-Ras1 y R-Ras2 en el SNC

A pesar de que estos estudios son muy preliminares, podemos afirmar que tanto R-Ras1 como R-Ras2 se expresan en diversas regiones del SNC, no solo en los tractos mielinizados, sino también en regiones mayoritariamente neuronales (corteza, hipocampo, retina) (Fig. 45, 47, 48). Estos resultados sugieren para R-Ras1 y R-Ras2 una función adicional, a la anteriormente descrita para los tractos mielinizados que será el objetivo de futuros estudios.

Posteriormente, con el fin de estudiar específicamente la expresión de R-Ras2 en corteza e hipocampo, regiones donde había sido descrita la expresión de R-Ras1 (Ivins et al., 2000; Negishi et al., 2005; Oinuma et al., 2007; Iwasawa et al., 2012), recurrimos a la técnica de X-Gal en el ratón *R-Ras2*^{-/-}. Las tinciones realizadas revelaron una alta expresión de R-Ras2 (Fig. 47) en corteza e hipocampo, tal como se vio reflejado en los Western blot y en los estudios de RT-qPCR (Fig. 46). Aun así, llamó nuestra atención el hecho de que el cuerpo calloso mostraba una tinción muy débil con el reactivo X-Gal (Fig. 47). Tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo específico contra β -galactosidasa, pusieron de manifiesto que la técnica empleada con el reactivo X-Gal no es eficaz para identificar R-Ras2 en los tractos mielinizados (Fig. 52).

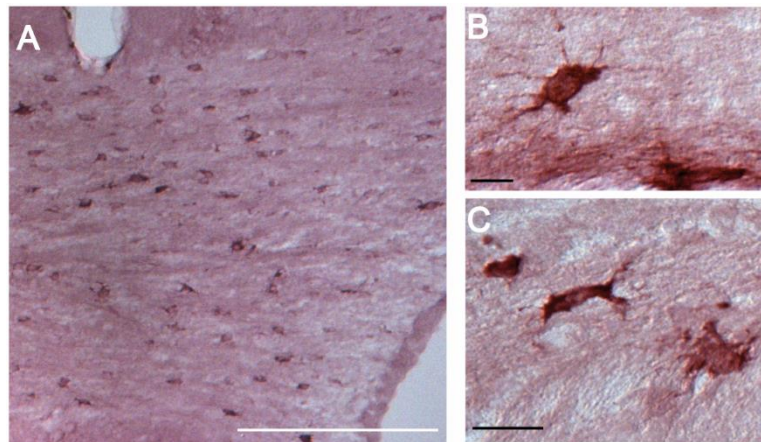


Figura 52: Expresión de R-Ras2 en cuerpo calloso. A-C, Tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti- β -Gal en cortes coronales de ratones adultos *R-Ras2*^{-/-} revelados con DAB en los que se observa la expresión de R-Ras2 en los OLs (B y C) del cuerpo calloso (A). n=3. Barras de escala: 250 μ m para A, 25 μ m para B y C.

Discusión

Para identificar los tipos celulares concretos en los que se expresan R-Ras1 y R-Ras2, realizamos marcajes específicos contra astrocitos, microglía y neuronas. Definimos así que R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en neuronas y OLs, pero no en astrocitos ni en microglía.

Dado que existe una relación directa entre la actividad de la neurona y la vaina que el OL genera a su alrededor, y puesto que R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en ambos tipos celulares, consideramos esencial seguir segregando las funciones que R-Ras1 y/o R-Ras2 desempeñan en los distintos tipos celulares.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. R-Ras1 y R-Ras2 se expresan en los OLs de los principales tractos mielinizados del SNC de ratones adultos.
2. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para el mantenimiento de la población de OLs en los principales tractos mielinizados del SNC.
3. R-Ras1 y R-Ras2 no participan en la génesis, en la proliferación ni en la migración de los OLs pero son esenciales para el mantenimiento de la supervivencia de los mismos.
4. R-Ras1 y R-Ras2 no participan en la estructura, compactación ni periodicidad de la mielina pero son necesarios para una correcta mielinización, teniendo cada una un papel aditivo y no redundante en la misma.
5. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para una correcta diferenciación y maduración de los OLs tanto *in vivo* como *in vitro*.
6. R-Ras1 y R-Ras2 participan en la maduración y supervivencia de los OLs al regular la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2/MAPK.
7. R-Ras1 y R-Ras2 modifican el tamaño y el número de nódulos de Ranvier y por tanto la longitud de los internodos.
8. R-Ras1 y R-Ras2 son esenciales para la correcta transmisión del impulso nervioso.
9. R-Ras1 y R-Ras2 no se expresan ni en microglía ni en astrocitos.
10. R-Ras1 y R-Ras2 también son expresadas por neuronas, pudiendo ejercer funciones específicas diferentes de las ya descritas para los tractos mielinizados.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Arora S, Matta A, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R (2005) Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 42:97-108.
- Bakiri Y, Karadottir R, Cossell L, Attwell D (2011) Morphological and electrical properties of oligodendrocytes in the white matter of the corpus callosum and cerebellum. *J Physiol* 589:559-573.
- Barker KT, Crompton MR (1998) Ras-related TC21 is activated by mutation in a breast cancer cell line, but infrequently in breast carcinomas in vivo. *Br J Cancer* 78:296-300.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46.
- Bartsch S, Montag D, Schachner M, Bartsch U (1997) Increased number of unmyelinated axons in optic nerves of adult mice deficient in the myelin-associated glycoprotein (MAG). *Brain Res* 762:231-234.
- Bechler ME, Byrne L, Ffrench-Constant C (2015) CNS Myelin Sheath Lengths Are an Intrinsic Property of Oligodendrocytes. *Curr Biol* 25:2411-2416.
- Bekku Y, Vargova L, Goto Y, Vorisek I, Dmytrenko L, Narasaki M, Ohtsuka A, Fassler R, Ninomiya Y, Sykova E, Oohashi T (2010) Bral1: its role in diffusion barrier formation and conduction velocity in the CNS. *J Neurosci* 30:3113-3123.
- Bercury KK, Dai J, Sachs HH, Ahrendsen JT, Wood TL, Macklin WB (2014) Conditional ablation of raptor or rictor has differential impact on oligodendrocyte differentiation and CNS myelination. *J Neurosci* 34:4466-4480.
- Bernards A, Settleman J (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* 14:377-385.
- Bishop AL, Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2:241-255.
- Boyle ME, Berglund EO, Murai KK, Weber L, Peles E, Ranscht B (2001) Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* 30:385-397.
- Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Muller T, Wende H, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyushkin K, Goebbels S, Fischer TM, Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH, Nave KA (2008) Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59:581-595.
- Bugiani M, Boor I, Powers JM, Scheper GC, van der Knaap MS (2010) Leukoencephalopathy with vanishing white matter: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:987-996.
- Butts BD, Houde C, Mehmet H (2008) Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: implications for normal development and disease. *Cell Death Differ* 15:1178-1186.
- Byrne J, Heidelberg R, Waxham MN (2014) From Molecules to Networks. An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience, Third edition Edition.
- Casaccia-Bonnel P, Tikoo R, Kiyokawa H, Friedrich V, Jr., Chao MV, Koff A (1997) Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Genes Dev* 11:2335-2346.
- Chapman H, Waclaw RR, Pei Z, Nakafuku M, Campbell K (2013) The homeobox gene Gsx2 controls the timing of oligodendroglial fate specification in mouse lateral ganglionic eminence progenitors. *Development* 140:2289-2298.
- Clark GJ, Kinch MS, Gilmer TM, Burridge K, Der CJ (1996) Overexpression of the Ras-related TC21/R-Ras2 protein may contribute to the development of human breast cancers. *Oncogene* 12:169-176.
- Colicelli J (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004:RE13.
- Combarros O, Calleja J, Polo JM, Berciano J (1987) Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurol Scand* 75:9-12.

- Cox AD, Der CJ (2002) Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther* 1:599-606.
- Crawford AH, Stockley JH, Tripathi RB, Richardson WD, Franklin RJ (2014) Oligodendrocyte progenitors: adult stem cells of the central nervous system? *Exp Neurol* 260:50-55.
- Cubelos B, Sebastian-Serrano A, Kim S, Moreno-Ortiz C, Redondo JM, Walsh CA, Nieto M (2008) Cux-2 controls the proliferation of neuronal intermediate precursors of the cortical subventricular zone. *Cereb Cortex* 18:1758-1770.
- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R (2000) NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 61:471-479.
- Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R (2003) NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 24:476-488.
- de Castro F, Bribian A (2005) The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Brain Res Rev* 49:227-241.
- de Waegh SM, Lee VM, Brady ST (1992) Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68:451-463.
- Delgado P, Cubelos B, Calleja E, Martinez-Martin N, Cipres A, Merida I, Bellas C, Bustelo XR, Alarcon B (2009) Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signaling. *Nat Immunol* 10:880-888.
- Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L, Lazzarini RA (1986) Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 102:384-392.
- Dyck PJ, Stevens JC, Mulder DW, Espinosa RE (1975) Frequency of nerve fiber degeneration of peripheral motor and sensory neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Morphometry of deep and superficial peroneal nerves. *Neurology* 25:781-785.
- Edvardson S, Hama H, Shaag A, Gomori JM, Berger I, Soffer D, Korman SH, Taustein I, Saada A, Elpeleg O (2008) Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia. *Am J Hum Genet* 83:643-648.
- Emery B (2010) Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330:779-782.
- Flores AI, Narayanan SP, Morse EN, Shick HE, Yin X, Kidd G, Avila RL, Kirschner DA, Macklin WB (2008) Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *J Neurosci* 28:7174-7183.
- Franklin RJ, Ffrench-Constant C (2008) Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 9:839-855.
- Frohman EM, Havrdova E, Lublin F, Barkhof F, Achiron A, Sharief MK, Stuve O, Racke MK, Steinman L, Weiner H, Olek M, Zivadinov R, Corboy J, Raine C, Cutter G, Richert J, Filippi M (2006) Most patients with multiple sclerosis or a clinically isolated demyelinating syndrome should be treated at the time of diagnosis. *Arch Neurol* 63:614-619.
- Fu H, Cai J, Clevers H, Fast E, Gray S, Greenberg R, Jain MK, Ma Q, Qiu M, Rowitch DH, Taylor CM, Stiles CD (2009) A genome-wide screen for spatially restricted expression patterns identifies transcription factors that regulate glial development. *J Neurosci* 29:11399-11408.
- Fujihara K, Leite MI (2013) Seronegative NMO: a sensitive AQP4 antibody test clarifies clinical features and next challenges. *Neurology* 80:2176-2177.
- Furusho M, Ishii A, Bansal R (2017) Signaling by FGF Receptor 2, Not FGF Receptor 1, Regulates Myelin Thickness through Activation of ERK1/2-MAPK, Which Promotes mTORC1 Activity in an Akt-Independent Manner. *J Neurosci* 37:2931-2946.
- Fyffe-Maricich SL, Karlo JC, Landreth GE, Miller RH (2011) The ERK2 mitogen-activated protein kinase regulates the timing of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 31:843-850.
- Gaesser JM, Fyffe-Maricich SL (2016) Intracellular Signaling Pathway Regulation of Myelination and Remyelination in the CNS. *Exp Neurol* 283:501-511.

- Garcia-Marques J, Nunez-Llaves R, Lopez-Mascaraque L (2014) NG2-glia from pallial progenitors produce the largest clonal clusters of the brain: time frame of clonal generation in cortex and olfactory bulb. *J Neurosci* 34:2305-2313.
- Gibson EM, Purger D, Mount CW, Goldstein AK, Lin GL, Wood LS, Inema I, Miller SE, Bieri G, Zuchero JB, Barres BA, Woo PJ, Vogel H, Monje M (2014) Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science* 344:1252304.
- Gieselmann V, Krageloh-Mann I (2010) Metachromatic leukodystrophy--an update. *Neuropediatrics* 41:1-6.
- Goebbels S, Oltrogge JH, Kemper R, Heilmann I, Bormuth I, Wolfer S, Wichert SP, Mobius W, Liu X, Lappe-Siefke C, Rossner MJ, Groszer M, Suter U, Frahm J, Boretius S, Nave KA (2010) Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination. *J Neurosci* 30:8953-8964.
- Goldman SA, Kuypers NJ (2015) How to make an oligodendrocyte. *Development* 142:3983-3995.
- Graham SM, Cox AD, Drivas G, Rush MG, D'Eustachio P, Der CJ (1994) Aberrant function of the Ras-related protein TC21/R-Ras2 triggers malignant transformation. *Mol Cell Biol* 14:4108-4115.
- Graham SM, Oldham SM, Martin CB, Drugan JK, Zohn IE, Campbell S, Der CJ (1999) TC21 and Ras share indistinguishable transforming and differentiating activities. *Oncogene* 18:2107-2116.
- Gutierrez-Erlandsson S, Herrero-Vidal P, Fernandez-Alfara M, Hernandez-Garcia S, Gonzalo-Flores S, Mudarra-Rubio A, Fresno M, Cubelos B (2013) R-RAS2 overexpression in tumors of the human central nervous system. *Mol Cancer* 12:127.
- Harding AE, Thomas PK (1980) The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103:259-280.
- Henneke M, Diekmann S, Ohlenbusch A, Kaiser J, Engelbrecht V, Kohlschutter A, Kratzner R, Madruga-Garrido M, Mayer M, Opitz L, Rodriguez D, Ruschendorf F, Schumacher J, Thiele H, Thoms S, Steinfeld R, Nurnberg P, Gartner J (2009) RNASET2-deficient cystic leukoencephalopathy resembles congenital cytomegalovirus brain infection. *Nat Genet* 41:773-775.
- Hildebrand C, Hahn R (1978) Relation between myelin sheath thickness and axon size in spinal cord white matter of some vertebrate species. *J Neurol Sci* 38:421-434.
- Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartmar C (1993) Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40:319-384.
- Huang Y, Saez R, Chao L, Santos E, Aaronson SA, Chan AM (1995) A novel insertional mutation in the TC21 gene activates its transforming activity in a human leiomyosarcoma cell line. *Oncogene* 11:1255-1260.
- Huff SY, Quilliam LA, Cox AD, Der CJ (1997) R-Ras is regulated by activators and effectors distinct from those that control Ras function. *Oncogene* 14:133-143.
- Huxley AF, Stampfli R (1949) Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *J Physiol* 108:315-339.
- Inaloo S, Haghbin S (2013) Multiple sclerosis in children. *Iran J Child Neurol* 7:1-10.
- Ishii A, Furusho M, Bansal R (2013) Sustained activation of ERK1/2 MAPK in oligodendrocytes and schwann cells enhances myelin growth and stimulates oligodendrocyte progenitor expansion. *J Neurosci* 33:175-186.
- Ishii A, Furusho M, Dupree JL, Bansal R (2014) Role of ERK1/2 MAPK signaling in the maintenance of myelin and axonal integrity in the adult CNS. *J Neurosci* 34:16031-16045.
- Ishii A, Furusho M, Dupree JL, Bansal R (2016) Strength of ERK1/2 MAPK Activation Determines Its Effect on Myelin and Axonal Integrity in the Adult CNS. *J Neurosci* 36:6471-6487.

- Ishii A, Fyffe-Maricich SL, Furusho M, Miller RH, Bansal R (2012) ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination. *J Neurosci* 32:8855-8864.
- Ivins JK, Yurchenco PD, Lander AD (2000) Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. *J Neurosci* 20:6551-6560.
- Iwasawa N, Negishi M, Oinuma I (2012) R-Ras controls axon branching through afadin in cortical neurons. *Mol Biol Cell* 23:2793-2804.
- Jeffries MA, Urbanek K, Torres L, Wendell SG, Rubio ME, Fyffe-Maricich SL (2016) ERK1/2 Activation in Preexisting Oligodendrocytes of Adult Mice Drives New Myelin Synthesis and Enhanced CNS Function. *J Neurosci* 36:9186-9200.
- Kamasawa N, Sik A, Morita M, Yasumura T, Davidson KG, Nagy JI, Rash JE (2005) Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience* 136:65-86.
- Kanfer JN, McCartney DG (1989) Regional and developmental estimations of glycerophosphorylcholine phosphodiesterase activities in rat brain. *Dev Neurosci* 11:26-29.
- Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9:173-179.
- Kimmelman AC, Nunez Rodriguez N, Chan AM (2002) R-Ras3/M-Ras induces neuronal differentiation of PC12 cells through cell-type-specific activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol* 22:5946-5961.
- Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN, Appel B (2006) In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci* 9:1506-1511.
- Klambt C (2009) Modes and regulation of glial migration in vertebrates and invertebrates. *Nat Rev Neurosci* 10:769-779.
- Kremer D, Aktas O, Hartung HP, Kury P (2011) The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors. *Ann Neurol* 69:602-618.
- Kremer D, Heinen A, Jadasz J, Gottle P, Zimmermann K, Zickler P, Jander S, Hartung HP, Kury P (2009) p57kip2 is dynamically regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis and interferes with oligodendroglial maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9087-9092.
- Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Bruck W (2008) Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 131:1749-1758.
- Lanciego JL, Goede PH, Witter MP, Wouterlood FG (1997) Use of peroxidase substrate Vector VIP for multiple staining in light microscopy. *J Neurosci Methods* 74:1-7.
- Larive RM, Abad A, Cardaba CM, Hernandez T, Canamero M, de Alava E, Santos E, Alarcon B, Bustelo XR (2012) The Ras-like protein R-Ras2/TC21 is important for proper mammary gland development. *Mol Biol Cell* 23:2373-2387.
- Lee X, Hu Y, Zhang Y, Yang Z, Shao Z, Qiu M, Pepinsky B, Miller RH, Mi S (2011) Oligodendrocyte differentiation and myelination defects in OMgp null mice. *Mol Cell Neurosci* 46:752-761.
- Lintas A, Schwaller B, Villa AE (2013) Visual thalamocortical circuits in parvalbumin-deficient mice. *Brain Res* 1536:107-118.
- Liu WN, Yan M, Chan AM (2017) A thirty-year quest for a role of R-Ras in cancer: from an oncogene to a multitasking GTPase. *Cancer Lett* 403:59-65.
- Liu Y, Wu Y, Lee JC, Xue H, Pevny LH, Kaprielian Z, Rao MS (2002) Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: an in situ and immunohistological analysis during embryonic development. *Glia* 40:25-43.

- Lubetzki C, Goujet-Zalc C, Gansmuller A, Monge M, Brillat A, Zalc B (1991) Morphological, biochemical, and functional characterization of bulk isolated glial progenitor cells. *J Neurochem* 56:671-680.
- Marignier R, Bernard-Valnet R, Giraudon P, Collongues N, Papeix C, Zephir H, Cavillon G, Rogemond V, Casey R, Frangoulis B, De Seze J, Vukusic S, Honnorat J, Confavreux C, Group NS (2013) Aquaporin-4 antibody-negative neuromyelitis optica: distinct assay sensitivity-dependent entity. *Neurology* 80:2194-2200.
- Marques S et al. (2016) Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science* 352:1326-1329.
- Marte BM, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J (1997) R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Curr Biol* 7:63-70.
- McCarthy KD, de Vellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85:890-902.
- McFall A, Ulku A, Lambert QT, Kusa A, Rogers-Graham K, Der CJ (2001) Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 21:5488-5499.
- McMorris FA (1983) Cyclic AMP induction of the myelin enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in rat oligodendrocytes. *J Neurochem* 41:506-515.
- Medina-Rodriguez EM, Arenzana FJ, Pastor J, Redondo M, Palomo V, Garcia de Sola R, Gil C, Martinez A, Bribian A, de Castro F (2013) Inhibition of endogenous phosphodiesterase 7 promotes oligodendrocyte precursor differentiation and survival. *Cell Mol Life Sci* 70:3449-3462.
- Meeren HK, Van Luijtelaar EL, Coenen AM (1998) Cortical and thalamic visual evoked potentials during sleep-wake states and spike-wave discharges in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 108:306-319.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700-703.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2002) Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 22:9742-9753.
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361:726-730.
- Movilla N, Crespo P, Bustelo XR (1999) Signal transduction elements of TC21, an oncogenic member of the R-Ras subfamily of GTP-binding proteins. *Oncogene* 18:5860-5869.
- Murcia-Belmonte V, Medina-Rodriguez EM, Bribian A, de Castro F, Esteban PF (2014) ERK1/2 signaling is essential for the chemoattraction exerted by human FGF2 and human anosmin-1 on newborn rat and mouse OPCs via FGFR1. *Glia* 62:374-386.
- Murcia-Belmonte V, Esteban PF, Martinez-Hernandez J, Gruart A, Lujan R, Delgado-Garcia JM, de Castro F (2016) Anosmin-1 over-expression regulates oligodendrocyte precursor cell proliferation, migration and myelin sheath thickness. *Brain Struct Funct* 221:1365-1385.
- Murphy GA, Graham SM, Morita S, Reks SE, Rogers-Graham K, Vojtek A, Kelley GG, Der CJ (2002) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase, but not RalGDS, in TC21/R-Ras2-mediated transformation. *J Biol Chem* 277:9966-9975.
- Narayanan SP, Flores AI, Wang F, Macklin WB (2009) Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination. *J Neurosci* 29:6860-6870.
- Nave KA, Werner HB (2014) Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:503-533.
- Negishi M, Oinuma I, Katoh H (2005) R-ras as a key player for signaling pathway of plexins. *Mol Neurobiol* 32:217-222.

- Ness JK, Mitchell NE, Wood TL (2002) IGF-I and NT-3 signaling pathways in developing oligodendrocytes: differential regulation and activation of receptors and the downstream effector Akt. *Dev Neurosci* 24:437-445.
- Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, Matsuda M (2000) Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275:20020-20026.
- Oinuma I, Katoh H, Negishi M (2007) R-Ras controls axon specification upstream of glycogen synthase kinase-3 β through integrin-linked kinase. *J Biol Chem* 282:303-318.
- Oinuma I, Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M (2004) The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* 305:862-865.
- Olsen IM, Ffrench-Constant C (2005) Dynamic regulation of integrin activation by intracellular and extracellular signals controls oligodendrocyte morphology. *BMC Biol* 3:25.
- Osada M, Tolkacheva T, Li W, Chan TO, Tschlis PN, Saez R, Kimmelman AC, Chan AM (1999) Differential roles of Akt, Rac, and Ral in R-Ras-mediated cellular transformation, adhesion, and survival. *Mol Cell Biol* 19:6333-6344.
- Pajevic S, Basser PJ, Fields RD (2014) Role of myelin plasticity in oscillations and synchrony of neuronal activity. *Neuroscience* 276:135-147.
- Pareyson D, Marchesi C (2009) Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* 8:654-667.
- Poliak S, Peles E (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* 4:968-980.
- Qi Y, Cai J, Wu Y, Wu R, Lee J, Fu H, Rao M, Sussel L, Rubenstein J, Qiu M (2001) Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* 128:2723-2733.
- Raff MC, Abney ER, Cohen J, Lindsay R, Noble M (1983) Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *J Neurosci* 3:1289-1300.
- Ramos M, Pardo B, Llorente-Folch I, Saheki T, Del Arco A, Satrustegui J (2011) Deficiency of the mitochondrial transporter of aspartate/glutamate aralar/AGC1 causes hypomyelination and neuronal defects unrelated to myelin deficits in mouse brain. *J Neurosci Res* 89:2008-2017.
- Ray A, Basu S, Miller NM, Chan AM, Dittel BN (2014) An increase in tolerogenic dendritic cell and natural regulatory T cell numbers during experimental autoimmune encephalomyelitis in Rras $^{-/-}$ mice results in attenuated disease. *J Immunol* 192:5109-5117.
- Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA (2018) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 378:169-180.
- Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ (2004) Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 14:639-647.
- Repasky GA, Cox AD, Hanker AB, Mitin N, Der CJ (2011) Role of R-Ras in Cell Growth. In: *Transduction Mechanisms in cellular signaling: Cell signaling collection* (Dennis EA, Bradshaw RA, eds): Academic Press.
- Rey I, Taylor-Harris P, van Erp H, Hall A (1994) R-ras interacts with rasGAP, neurofibromin and c-raf but does not regulate cell growth or differentiation. *Oncogene* 9:685-692.
- Richardson AG, McIntyre CC, Grill WM (2000) Modelling the effects of electric fields on nerve fibres: influence of the myelin sheath. *Med Biol Eng Comput* 38:438-446.
- Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermarck B, Dubois-Dalcq M (1988) A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* 53:309-319.
- Rivella S, May C, Chadburn A, Riviere I, Sadelain M (2003) A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer. *Blood* 101:2932-2939.

- Robaglia-Schlupp A, Pizant J, Norreel JC, Passage E, Saberan-Djoneidi D, Ansaldi JL, Vinay L, Figarella-Branger D, Levy N, Clarac F, Cau P, Pellissier JF, Fontes M (2002) PMP22 overexpression causes dysmyelination in mice. *Brain* 125:2213-2221.
- Rodriguez-Viciano P, Sabatier C, McCormick F (2004) Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol* 24:4943-4954.
- Romanelli RJ, Mahajan KR, Fulmer CG, Wood TL (2009) Insulin-like growth factor-I-stimulated Akt phosphorylation and oligodendrocyte progenitor cell survival require cholesterol-enriched membranes. *J Neurosci Res* 87:3369-3377.
- Rong R, He Q, Liu Y, Sheikh MS, Huang Y (2002) TC21 mediates transformation and cell survival via activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 21:1062-1070.
- Rosario M, Paterson HF, Marshall CJ (1999) Activation of the Raf/MAP kinase cascade by the Ras-related protein TC21 is required for the TC21-mediated transformation of NIH 3T3 cells. *EMBO J* 18:1270-1279.
- Rosario M, Paterson HF, Marshall CJ (2001) Activation of the Ral and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways by the ras-related protein TC21. *Mol Cell Biol* 21:3750-3762.
- Sanchez I, Hassinger L, Paskevich PA, Shine HD, Nixon RA (1996) Oligodendroglia regulate the regional expansion of axon caliber and local accumulation of neurofilaments during development independently of myelin formation. *J Neurosci* 16:5095-5105.
- Sanz-Rodriguez M, Gruart A, Escudero-Ramirez J, de Castro F, Delgado-García JM, Wandosell F, Cubelos B (2018) R-Ras1 and R-Ras2 are essential for oligodendrocyte differentiation and survival for correct myelination in the central nervous system. *Journal of Neuroscience*.
- Saugier-Verber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, Le Merrer M, Gil R, Boespflug-Tanguy O (1994) X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat Genet* 6:257-262.
- Savvaki M, Panagiotaropoulos T, Stamatakis A, Sargiannidou I, Karatzioula P, Watanabe K, Stylianopoulou F, Karagogeos D, Kleopa KA (2008) Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. *Mol Cell Neurosci* 39:478-490.
- Sawada J, Komatsu M (2012) Normalization of tumor vasculature by R-Ras. *Cell Cycle* 11:4285-4286.
- Sawada J, Urakami T, Li F, Urakami A, Zhu W, Fukuda M, Li DY, Ruoslahti E, Komatsu M (2012) Small GTPase R-Ras regulates integrity and functionality of tumor blood vessels. *Cancer Cell* 22:235-249.
- Schmidt A, Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587-1609.
- Self AJ, Caron E, Paterson HF, Hall A (2001) Analysis of R-Ras signalling pathways. *J Cell Sci* 114:1357-1366.
- Shang X, Cancelas JA, Li L, Guo F, Liu W, Johnson JF, Ficker A, Daria D, Geiger H, Ratner N, Zheng Y (2011) R-Ras and Rac GTPase cross-talk regulates hematopoietic progenitor cell migration, homing, and mobilization. *J Biol Chem* 286:24068-24078.
- Sharma R, Sud N, Chattopadhyay TK, Ralhan R (2005) TC21/R-Ras2 upregulation in esophageal tumorigenesis: potential diagnostic implications. *Oncology* 69:10-18.
- Singh G, Hashimoto D, Yan X, Helft J, Park PJ, Ma G, Qiao RF, Kennedy CR, Chen SH, Merad M, Chan AM (2012) R-Ras is required for murine dendritic cell maturation and CD4+ T-cell priming. *Blood* 119:1693-1701.
- Snaidero N, Mobius W, Czopka T, Hekking LH, Mathisen C, Verkleij D, Goebbels S, Edgar J, Merkler D, Lyons DA, Nave KA, Simons M (2014) Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* 156:277-290.

- Sommer I, Schachner M (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83:311-327.
- Spassky N, de Castro F, Le Bras B, Heydon K, Queraud-LeSaux F, Bloch-Gallego E, Chedotal A, Zalc B, Thomas JL (2002) Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J Neurosci* 22:5992-6004.
- Sturrock RR (1980) Myelination of the mouse corpus callosum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 6:415-420.
- Sun D, Lye-Barthel M, Masland RH, Jakobs TC (2009) The morphology and spatial arrangement of astrocytes in the optic nerve head of the mouse. *J Comp Neurol* 516:1-19.
- Tanaka H, Ma J, Tanaka KF, Takao K, Komada M, Tanda K, Suzuki A, Ishibashi T, Baba H, Isa T, Shigemoto R, Ono K, Miyakawa T, Ikenaka K (2009) Mice with altered myelin proteolipid protein gene expression display cognitive deficits accompanied by abnormal neuron-glia interactions and decreased conduction velocities. *J Neurosci* 29:8363-8371.
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL (2005) Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47:681-694.
- Tekki-Kessarlis N, Woodruff R, Hall AC, Gaffield W, Kimura S, Stiles CD, Rowitch DH, Richardson WD (2001) Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* 128:2545-2554.
- Tomassy GS, Dershowitz LB, Arlotta P (2016) Diversity Matters: A Revised Guide to Myelination. *Trends Cell Biol* 26:135-147.
- Traiffort E, Zakaria M, Laouarem Y, Ferent J (2016) Hedgehog: A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage. *J Dev Biol* 4.
- Tyler WA, Gangoli N, Gokina P, Kim HA, Covey M, Levison SW, Wood TL (2009) Activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) is essential for oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 29:6367-6378.
- Vanderver A, Simons C, Schmidt JL, Pearl PL, Bloom M, Lavenstein B, Miller D, Grimmond SM, Taft RJ (2014) Identification of a novel de novo p.Phe932Ile KCNT1 mutation in a patient with leukoencephalopathy and severe epilepsy. *Pediatr Neurol* 50:112-114.
- Wahl SE, McLane LE, Bercury KK, Macklin WB, Wood TL (2014) Mammalian target of rapamycin promotes oligodendrocyte differentiation, initiation and extent of CNS myelination. *J Neurosci* 34:4453-4465.
- Wang S, Young KM (2014) White matter plasticity in adulthood. *Neuroscience* 276:148-160.
- Waxman SG (1980) Determinants of conduction velocity in myelinated nerve fibers. *Muscle Nerve* 3:141-150.
- Waxman SG (1997) Axon-glia interactions: building a smart nerve fiber. *Curr Biol* 7:R406-410.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118:843-846.
- Wiggins RC, Fuller GN, Dafny N (1982) Propagation of photic evoked responses recorded from the retina, optic chiasm, lateral geniculate body, and visual cortex of the nutritionally rehabilitated rat visual system. *Exp Neurol* 77:644-653.
- Wittinghofer A, Nassar N (1996) How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci* 21:488-491.
- Wolswijk G (1998) Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci* 18:601-609.
- Wong LJ (2012) Mitochondrial syndromes with leukoencephalopathies. *Semin Neurol* 32:55-61.
- Woodruff RH, Tekki-Kessarlis N, Stiles CD, Rowitch DH, Richardson WD (2001) Oligodendrocyte development in the spinal cord and telencephalon: common themes and new perspectives. *Int J Dev Neurosci* 19:379-385.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT (2008) Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* 130:635-653.

Zuchero JB, Fu MM, Sloan SA, Ibrahim A, Olson A, Zaremba A, Dugas JC, Wienbar S, Caprariello AV, Kantor C, Leonoudakis D, Lariosa-Willingham K, Kronenberg G, Gertz K, Soderling SH, Miller RH, Barres BA (2015) CNS myelin wrapping is driven by actin disassembly. *Dev Cell* 34:152-167.

Anexo I: Publicaciones

ANEXO I: PUBLICACIONES

Sanz-Rodríguez M., Gruart A., Escudero-Ramirez J., de Castro F, Delgado-García JM., Wandosell F., Cubelos B. *R-Ras1 and R-Ras2 are essential for oligodendrocyte differentiation and survival for correct myelination in the central nervous system.* The Journal of Neuroscience.

Gonzalez-Riano C., **Sanz-Rodríguez M.**, Escudero-Ramirez J., Lorenzo MP., Barbas C., Cubelos B., Garcia A. *Target and untargeted GC-MS based metabolomic study of mouse optic nerve and its potential in the study of neurological visual diseases.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Volume 153, 10 May 2018, Pages 44-56